

МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И МЕТОДЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

Обзор

© 2014 М.В. Патрушев^{1,2}, П.А. Каменский^{1,2*},
И.О. Мазунин^{2*}

¹ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12; факс +7(495)939-4309, электронная почта: peter@protein.bio.msu.ru*

² *Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, 236038 Калининград, ул. Александра Невского, 14; факс +7(4012)595-595, электронная почта: IMazunin@kantiana.ru*

Поступила в редакцию 31.06.14
После доработки 14.08.14

Митохондрии – это единственные, кроме ядра, клеточные органеллы животных клеток, содержащие свой собственный геном. Митохондриальная ДНК значительно меньше ядерной по размерам и кодирует всего несколько десятков биологических макромолекул. Тем не менее, мутации в митохондриальных генах часто приводят к развитию тяжелых наследственных заболеваний нейромышечного характера. В научной литературе постоянно появляются все новые и новые работы, описывающие ранее не идентифицированные мутации в ДНК митохондрий и их связи с клиническими симптомами. В данном обзоре мы сводим воедино всю имеющуюся на сегодняшний день информацию о таких мутациях, а также о разработанных к настоящему моменту генно-терапевтических подходах к их супрессии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондриальный геном, митохондриальная ДНК, мутации, митохондриальные заболевания, генная терапия.

Болезни, обусловленные нарушениями в структуре митохондриальной ДНК (мтДНК), представлены широким спектром самых разнообразных заболеваний. Общая численность описанных на сегодняшний день в научной литературе болезней митохондриального происхождения приближается к 400. Эти болезни на фенотипическом уровне в большинстве своем выражаются в различных нейродегенеративных и нейромышечных симптомах [1]. Первое описание митохондриальной болезни датируется 1962 г. [2]; заболевание было выявлено у женщины с симптомокомплексом гиперметаболизма, не ассоциированного с дисфункцией щитовидной железы. Существовавшие в те годы методы позволили лишь провести анализ биоптата скелетной мускулатуры на структурные и некоторые биохимические изменения, имевшие место в митохондриях пациента. Очевидно, что дан-

ная работа не выявила ни молекулярного происхождения патологии, ни механизмов ее взаимосвязи с симптомокомплексом. Тем не менее, это исследование послужило мощным толчком к развитию отдельного направления молекулярной медицины, направленного на изучение участия митохондрий в различных патогенетических процессах. В течение большей части второй половины XX в. производились исследования комплексов дыхательной цепи в норме и их структурных и функциональных изменений при патологиях. На основе этих работ в 1985 г. была создана первая, но все еще актуальная классификация митохондриальных болезней, основанная на биохимических показателях функции этих органелл [3]. Параллельно проводилось изучение строения и функций мтДНК, которые были открыты в 1963 г. [4]. Так, в 1982 г. группой Джузеппе Аттарди были предложены механизмы репликации и транскрипции мтДНК [5]. 1988 год считается моментом начала «молекулярной эры» митохондриальных болезней. Именно в этом году практически одновременно

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК, п.н. – пары нуклеотидов.

* Адресат для корреспонденции.

в научной печати появились две независимые работы, в которых описывались ассоциации полиморфизмов мтДНК и клинических фенотипов [6, 7]. Аналогичные исследования проводятся и по сей день, однако теперь они носят уже комплексный характер, затрагивая множество различных областей биологии клетки [8]. Все подтвержденные данные о полиморфизмах мтДНК, связанных с ними симптомокомплексах, а также другая значимая информация о функционировании генетического аппарата митохондрий, депонируются в специализированных базах данных MITOMAP (<http://mitomap.org>) и mtDB (<http://www.mtddb.igp.uu.se>).

В настоящем обзоре рассматриваются основные отличия митохондриальной генетики от менделевской, приводится современная классификация митохондриальных болезней и условия отнесения мутаций к списку патогенных, а также описываются некоторые молекулярные подходы к коррекции конкретных мутаций мтДНК. Особое внимание уделяется созданным за последние годы новым способам супрессии мутаций в митохондриальном геноме.

ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии – единственные, кроме ядра, органеллы клеток млекопитающих, имеющие собственный биосинтетический аппарат, включающий ДНК, а также белки, необходимые для реализации и передачи информации, закодированной в ДНК. Многие белки биосинтетического аппарата митохондрий напрямую взаимодействуют с мтДНК, образуя при этом супермолекулярные комплексы, названные нуклеоидами. Каждый нуклеоид включает 1–10 молекул мтДНК, ассоциированных с гистоноподобными белками и белками, участвующими в транскрипции и трансляции мтДНК [9]. МтДНК человека имеет кольцевую структуру, относительно небольшой размер (16 659 п.н.) и включает в себя 13 структурных генов, 22 гена тРНК и 2 гена рРНК [10].

Среди характерных свойств мтДНК, отличающих ее от ядерной ДНК, следует отметить многокопийность, которая выражается в присутствии, в среднем, 1000 копий молекул мтДНК на клетку, а также примерно в 20 раз более высокую частоту мутаций по сравнению с ядерной ДНК. Отдельно стоит упомянуть о гетероплазмии – феномене, выражающемся в одновременном присутствии в одной клетке нескольких вариантов мтДНК, отличающихся по длине и набору генов.

Среди функциональных проявлений описанных свойств мтДНК необходимо особо отме-

тить те, которые непосредственно влияют на клиническую картину, являющуюся следствием мутаций. Прежде всего, это так называемый пороговый эффект гетероплазмии, заключающийся в существовании некоего минимального количества мутантных копий мтДНК относительно количества нормальных копий, при котором мутация проявляется фенотипически (иными словами – в виде клинических симптомов). Считается, что при 70% гетероплазмии клинически проявляется любая мутация мтДНК [11]. Однако следует отметить, что данный уровень весьма условен, а взаимосвязь между симптомокомплексом и уровнем гетероплазмии носит индивидуальный характер [12].

МтДНК имеет также ряд особенностей при ее передаче следующим поколениям. Так, в подавляющем большинстве случаев мтДНК наследуется по материнской линии [13]. На сегодняшний день известно лишь об одном случае отцовского наследования, причем с клиническими последствиями, проявившимися у носителя в виде снижения переносимости физических нагрузок [14]. В связи с этим, отцовские мутации мтДНК потомству не передаются.

При митозе митохондрии распределяются случайным образом, и дочерние клетки могут различаться по уровню гетероплазмии [15]. Это явление было названо митотической сегрегацией. Была предложена модель, согласно которой скорость сдвига в сторону мутантных мтДНК либо мтДНК дикого типа определяется составом нуклеоида родительской клетки [16]. В соответствии с этой моделью и мутантная мтДНК, и мтДНК дикого типа могут входить в состав одного нуклеоида (гетероплазматический нуклеоид) либо в отдельные нуклеоиды (гомоплазматический нуклеоид). Если материнская клетка содержит гетероплазматические нуклеоиды, то колебание уровня гетероплазмии дочерних клеток остается незначительным, однако в случае гомоплазматических нуклеоидов уровень гетероплазмии дочерних клеток различается весьма значительно и зависит от отбора и генетического дрейфа. С другой стороны, уровень гетероплазмии мтДНК при первых трех зиготических делениях остается постоянным во всех бластомерах, и только в шестнадцатиклеточном эмбрионе наблюдается первый сдвиг в ту или иную сторону. В яйцеклетке и полярном тельце уровень гетероплазмии также является одинаковым [17].

При оценке риска отягощенной наследственности по мутациям мтДНК особое значение имеет так называемый эффект бутылочного горлышка, который проявляется в различном уровне гетероплазмии у матери и ребенка. Так,

для одной из мутаций показано, что если у матери уровень гетероплазмии менее 25%, то треть детей не будет иметь патогенной мутации. Если же уровень гетероплазмии превышал 25%, то все участвовавшие в исследовании дети таких матерей имели патогенную мутацию [18]. Этот феномен обусловлен биогенезом митохондрий: в яйцеклетке до момента оплодотворения присутствует около 200 тыс. митохондрий, но после оплодотворения происходит череда зиготических делений без деления митохондрий, в результате чего с каждым таким делением количество митохондрий в бластомере уменьшается вдвое. Впоследствии первичные половые клетки содержат всего примерно 10 митохондрий. Таким образом, при формировании предшественников половых клеток митохондрии составляют лишь малую часть от изначального набора митохондрий зиготы [19]. Как следствие, потомок может иметь совершенно иной вариант мтДНК.

КЛАССИФИКАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ И МУТАЦИЙ мтДНК

Митохондрии являются полуавтономными органеллами: их биогенез и функции зависят не только от структуры генов мтДНК, но в большой степени и от ядерных генов, продукты которых принимают непосредственное участие в жизнедеятельности этих органелл. Так, по данным, полученным методами биоинформатики, часть из которых подтверждена экспериментально [20], функции митохондрий определяют около 2000 белков; при этом только 13 из них кодируются непосредственно геномом органеллы, а остальные закодированы в ядерной ДНК и импортируются из цитозоля [21]. В связи с этим очевидно, что большинство болезней, обусловленных дисфункцией митохондрий, берут свое начало в генах, локализованных в ядре. Этот

факт делает проблематичной классификацию митохондриальных болезней. Одна из часто используемых классификаций основана на функциях генов, мутации в которых приводят к клиническому фенотипу (табл. 1).

В данном обзоре мы не будем рассматривать мутации ядерных генов, т.к. их классификация и подходы к генной терапии соответствующих заболеваний не отличаются от таковых для других болезней, вызываемых мутациями в ядерной ДНК.

Универсальной классификации мутаций мтДНК до сих пор не существует. Это обусловлено особенностями наследования и биогенеза митохондрий. Наиболее важным с клинической точки зрения является определение патогенности мутаций мтДНК. В 2012 г. Вонг [22] предложил условную классификацию, которая в настоящее время используется чаще всего (табл. 2).

Учитывая относительно высокую частоту мутаций мтДНК, обнаруживаемые в ней полиморфные варианты последовательности следует тщательно оценивать на предмет их ассоциаций с клиническими фенотипами. В противном случае может возникнуть ситуация, в которой исследователи, проведя полное секвенирование мтДНК и обнаружив в последней некую мутацию, сразу же называют ее патогенной, поскольку пациент, чья мтДНК анализировалась, имел определенную клиническую картину. Тем не менее, для того, чтобы назвать мутацию «патогенной», необходимо провести множество экспериментов, начиная от биоинформатического анализа и заканчивая опытами в модельных системах и различными биохимическими тестами.

Для унификации процедуры отнесения полиморфизма к конкретному патогенному варианту мтДНК был разработан ряд критериев, позволяющих принять решение об отнесении мутации к тому или иному варианту, обозначенному в табл. 2 [23]. Следует отметить, что предложен-

Таблица 1. Мутации, вызывающие нарушения митохондриальной функции

Митохондриальные	Ядерные
Мутации структурных генов	мутации генов, обеспечивающих стабильность мтДНК
Мутации генов рРНК и тРНК	мутации генов факторов сборки комплекса окислительного фосфорилирования
Структурные перестройки, затрагивающие большие сегменты мтДНК	мутации генов, обеспечивающих процесс трансляции в митохондриях мутации генов, продукты которых принимают участие в процессах деления и слияния митохондрий

Таблица 2. Критерии подразделения мутаций мтДНК на варианты

Вариант мтДНК	Критерии
Патогенный вариант	мтДНК содержит мутацию, которая аннотирована в MITOMAP как мутация с подтвержденным патологическим эффектом. Эта мутация была обнаружена в нескольких неродственных пациентах или семьях с определенной клинической картиной и описанным патогенезом
Непатогенный вариант	мтДНК содержит мутацию, охарактеризованную в базе данных MITOMAP как полиморфный вариант мтДНК, не имеющую ассоциации с какой-либо клинической симптоматикой
Неклассифицированный вариант	мтДНК содержит мутацию, которая соответствует хотя бы одному из следующих критериев: 1) выявленная нуклеотидная замена является новым вариантом, не представленным в базах данных; 2) данный вариант представлен как редкий полиморфизм в базе данных MITOMAP либо опубликован в mtDB с частотой выше 0,2%; 3) редкий вариант опубликован в научной литературе либо базе данных MITOMAP как патогенная мутация, однако это предположение было основано на основании анализа одной родословной, либо в ходе выявления этой мутации нет данных о ее патогенности

ные критерии необходимо рассматривать именно в том порядке, в котором они приводятся. Во-первых, мутация не должна являться уже известным полиморфизмом мтДНК. Иными словами, критерии изначально задают рамки, в которые не попадают описанные полиморфизмы, что в целом не очень справедливо, т.к., теоретически, даже известная непатогенная мутация может стать патогенной при определенных внешних условиях. Во-вторых, мутация локализована в эволюционно-консервативном и функционально значимом сегменте мтДНК. Здесь обращает на себя внимание формулировка «функционально значимый». Дело в том, что каждый сегмент мтДНК выполняет какую-либо функцию, и вследствие этого данный критерий приобретает некоторую расплывчатость. В-третьих, мутация должна находиться в состоянии гетероплазмы, уровень которой должен хотя бы до некоторой степени коррелировать с клинической картиной и, более того, с функциональным нарушением в тканях. Важность последних критериев на первый взгляд очевидна. Однако существует несколько факторов, не позволяющих адекватно применять эти критерии. Главный из них — это методологическая сложность и неоднозначность оценки гетероплазмы. Кроме того, некоторые заболевания, ассоциированные с мутациями мтДНК, не всегда сопровождаются гетероплазмией. Так, в частности, для мутаций, ассоциированных с наследственной оптической нейропатией Лебера (LHON, OMIM # 535000) и некоторыми спонтанными оптическими нейропатиями, харак-

терно состояние гомоплазмы. Более того, пенетрантность данных мутаций очень низка — они поражают лишь половину носителей мужского пола и лишь десятую часть женщин [24].

Учитывая вышесказанное, представляется логичным использовать более приемлемые критерии, в основу которых положены измеряемые факторы и валидированные методы. Такие критерии также были предложены [24]. В соответствии с ними, мутация мтДНК для отнесения ее к патогенной должна отвечать следующим требованиям:

1) не являться синонимичной, т.е. не приводить к замене кодируемой аминокислоты (в случае мутации в гене белка);

2) не быть представленной в имеющихся базах данных в качестве подтвержденного полиморфизма;

3) отсутствовать в этнически сопоставимом здоровом контроле;

4) не являться гаплогрупп-специфическим полиморфизмом;

5) локализоваться в регионе мтДНК с высокой межвидовой консервативностью;

6) быть оцененной в качестве потенциально патогенной мутации при помощи специального программного обеспечения. Данный пункт применим только к мутациям в генах белков, поскольку большинство алгоритмов, используемых для оценки потенциальной патогенности, предсказывает влияние данной конкретной мутации на структуру и функцию мутантного белка.

В следующей главе мы обсудим методы коррекции мутаций мтДНК. В номенклатуре мута-

ций мтДНК приняты следующие правила. Сначала пишется буква *m*, обозначающая факт возникновения мутации именно в мтДНК. Следующим обозначается номер позиции измененного нуклеотида в геноме митохондрии. Далее пишется нуклеотид, изначально находящийся в мтДНК (А, Т, G, С). Затем после знака > ставится нуклеотид, появившийся в данной позиции вследствие мутации. В последнюю очередь в скобках прописывается ген, в составе которого возникла мутация. Для примера разберем обозначение мутации, связанной с LNDH, а именно *m.3460G>A (ND1)*. Подобная запись обозначает, что в геноме митохондрий в положении 3460 гена первой субъединицы NADH-дегидрогеназы произошла замена гуанина на аденин.

КОРРЕКЦИЯ МУТАЦИЙ мтДНК

Несмотря на то, что экспериментальные методы коррекции мутаций мтДНК все еще находятся на ранних стадиях разработки, каждый последующий удачный эксперимент все больше приближает нас к тому моменту, когда генная терапия митохондриальных заболеваний станет рутинной лечебной практикой. В настоящее время эксперименты по супрессии мутаций в митохондриальном геноме проводятся только на культурах клеток человека. Это связано с тем, что до сих пор не разработано ни одной адекватной животной модели митохондриальных заболеваний.

К современным методам, направленным на устранение дефектов дыхательной цепи, относятся стратегии аллотопической (трансформация клетки нормальной копией дефектного гена того же вида организма) и ксенотопической (трансформация клетки нормальной копией дефектного гена другого вида организма) экспрессий, доставка молекул РНК в митохондрии, манипулирование уровнем гетероплазмы, а также доставка «терапевтического материала» в липосомах [25]. В табл. 3 представлены различные экспериментальные методы коррекции мутантных вариантов мтДНК и конкретные патогенные мутации, для супрессии которых используются данные методы.

Патогенная мутация ***m.8993T>G (MT-ATP6)*** локализуется в гене 6-й субъединицы АТФ-синтазы F_0 и приводит к замене высококонсервативного остатка лейцина на пролин, что вызывает снижение тока протонов через АТФ-синтазу на 30% [48, 49]. Клинически мутация проявляется в виде невропатии, атаксии и пигментной ретинопатии, синдрома, известного в англоязычной литературе как NARP (OMIM # 551500).

Уровень гетероплазмы при этом должен составлять 70–90% [50]. При повышении количества мутантных митохондриальных геномов до 90–95% развивается клиническая картина наследуемого по материнской линии синдрома Лея (в англоязычной литературе MILS, OMIM # 256000) [51].

Предпринято несколько попыток исправить дефект работы митохондрий, вызванных данной мутацией. Так, используя стратегию аллотопической экспрессии нормальной копии гена из ядра, несколько коллективов успешно компенсировали проявление этой мутации. Первой такой работой стал эксперимент, в котором клеточная линия от пациентов с MILS, имеющая мутацию *m.8993T>G (MT-ATP6)* в состоянии гомоплазмы, была трансфицирована конструкцией, включающей ген *ATP6*. В результате после трансфекции наблюдали достоверное повышение количества вырабатываемого АТФ [26].

Для супрессии описываемой мутации была также применена стратегия ксенотопической экспрессии. Ген *CrATP6* зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* был использован для трансфекции линии человеческих клеток, содержащих мутацию *m.8993T>G (MT-ATP6)* в состоянии гомоплазмы. В данном эксперименте использовались так называемые гибридные клетки, получаемые путем слияния двух типов клеток: здоровых клеток, из которых удалены митохондрии, и клеток с мутацией мтДНК, из которых удалены ядра. Синтез АТФ в получившихся гибридных клетках до трансфекции составлял 35% от нормы, тогда как после трансфекции стационарная концентрация АТФ выросла до 75% [29]. В другом исследовании была создана конструкция, включающая последовательность гена *ATP6*, соединенного с частью гена супероксиддисмутазы-2 (*SOD2*), кодирующей сигнальную последовательность, направляющую импорт белка в митохондрии [27]. Получившийся гибридный белок, таким образом, также мог импортироваться в органеллы. Для трансфекции использовались фибробласты, уровень гетероплазмы *m.8993T>G (MT-ATP6)* в которых составлял 95%. До внесения конструкции синтез АТФ в фибробластах был понижен на 61–74% относительно контрольного, однако после трансфекции наблюдали повышение уровня АТФ до нормальных значений [28]. В другом эксперименте была задействована модифицированная метилаза типа «цинковые пальцы» – белок, стабилизированный одним или двумя ионами цинка, связанными координационными связями с аминокислотными остатками. Искусственный белок был сконструирован таким образом, что он специфически связывался только с мутантной, но не с нормальной

Таблица 3. Экспериментальные методы коррекции мутаций мтДНК

Заболевание	Мутация мтДНК	Генно-терапевтическая стратегия						
		аллотиопическая экспрессия	ксенотопическая экспрессия	коррекция системы трансляции (тРНК)	эндонуклеазы рестрикции	метилазы типа «цинковые пальцы»	TAL-эффекторные нуклеазы	химерные и модифицированные олигонуклеотиды
NARP (невропатия, атаксия и пигментная ретинопатия)/MILS (синдром Лея)	m.8993T>G (MT-ATP6)	[26–28]	[29]		[30–32]	[33, 34]		
LHON (наследственная оптическая нейропатия Лебера)	m.11778G>A (MT-ND4) m.3460G>A (MT-ND1)	[28, 35, 36] [38]	[37]					
MERRF (миоклональная эпилепсия и рваные красные мышечные волокна)	m.G14459G>A (MT-ND6) m.8344A>G (MT-TK)		[40]	[41–44]			[39]	
MELAS (митохондриальная энцефалопатия с инсультоподобными эпизодами и лактат-ацидозом)	m.611G>A (MT-TF) m.3243A>G (MT-TL1)			[43, 45, 46]				
KSS (синдром Кернса–Сейра)	основная делеция (common deletion), 8482–13460 п.н.						[39]	[47]

мтДНК. Было показано, что данный белок вызывает селективное метилирование остатков цитозина в мутантных копиях мтДНК, что может препятствовать ее репликации и увеличивать количество мтДНК дикого типа [33]. В более новой работе «цинковые пальцы» были модифицированы таким образом, что связывались специфично с последовательностью мтДНК, содержащей мутацию m.8993T>G (MT-ATP6), приводя к формированию двуцепочечного разрыва мутантной мтДНК. Для эксперимента была использована клеточная линия с уровнем гетероплазмии патогенной мутации 93%. После действия «цинковых пальцев» количество мутантных мтДНК уменьшилось до 83% [34].

Одним из направлений в коррекции мутаций мтДНК является использование эндонуклеаз рестрикции, которые специфически узнают сайты мутирования и элиминируют мутантную

мтДНК [52]. Была сконструирована векторная молекула, доставляющая в митохондрии рестриктазу *SmaI*, которая специфически разрезает мтДНК, содержащую m.8993T>G (MT-ATP6). Элиминация патогенного варианта мтДНК приводила к восполнению популяции мтДНК дикого типа, восстановлению внутриклеточного уровня АТФ и нормализации мембранного потенциала митохондрий [30]. Другая конструкция включала рестриктазу *XmaI* и последовательность, направляющую ее в митохондрию. После трансфекции наблюдалось селективное разрушение мутантных вариантов мтДНК m.8993T>G (MT-ATP6), а в клетках восстанавливались поглощение кислорода и выработка АТФ [31]. Показано, что конструкции, включающие рестриктазы, могут приводить к сдвигу уровня гетероплазмии в тканях мышей, причем специфически в определенных органах. Так,

введение вирусного вектора с этой конструкцией мышам, мтДНК которых представлена двумя разными вариантами, приводило к сдвигу уровня гетероплазмии в сердечной и скелетной мускулатуре [32]. К сожалению, использование эндонуклеаз рестрикции для супрессии мутаций в митохондриальном геноме имеет одно весьма существенное ограничение: для успешного применения этого подхода необходимо, чтобы в результате мутации в молекуле мтДНК формировался уникальный сайт рестрикции.

Мутация **m.11778G>A (MT-ND4)** ассоциирована с LHON, что клинически характеризуется дегенерацией ганглиозного слоя сетчатки и атрофией зрительного нерва. Эта мутация приводит к замене аргинина на гистидин в 340-й позиции четвертой субъединицы NADH-дегидрогеназы первого комплекса и выявляется у 69% пациентов LHON [53]. Используя стратегию аллотропной экспрессии, создали векторную систему, включающую последовательность гена *ND4*, не содержащего **m.11778G>A (MT-ND4)**. До трансфекции в гибридах вся мтДНК была представлена мутантными вариантами, вследствие чего уровень АТФ был снижен на 60%. После трансфекции удалось добиться увеличения уровня выработки АТФ в 3 раза [35]. Подобная стратегия была использована другими исследователями, которые добились экспрессии гена *ND4*, соединенного с частью гена *COX10*, кодирующей сигнальную последовательность соответствующего белка. В результате удалось достичь почти полного восстановления уровня АТФ в гибридных клетках [28]. Используя NADH-оксидоредуктазу (ND11) из *Saccharomyces cerevisiae* в качестве донора электронов дыхательной цепи, был восстановлен рост клеток с **m.11778G>A (MT-ND4)** на питательной среде с галактозой, хотя уровень АТФ не удалось восстановить полностью [37]. В другом оригинальном исследовании был сконструирован вирусный вектор, который проникает в митохондрии специфическим образом, доставляя туда вложенную в него конструкцию. Трансфекция такой конструкцией культуры клеток, содержащих мтДНК с **m.11778G>A (MT-ND4)**, приводила к нормализации уровня АТФ [36]. Далее, была сконструирована система, содержащая мутантный вариант гена *ND4* (**m.11778G>A (MT-ND4)**), которая была доставлена в полость стекловидного тела мышей. В результате у мышей была обнаружена дегенерация ганглиозного слоя сетчатки и атрофия зрительного нерва, что характеризует LHON у людей.

Мутация **m.3460G>A (MT-ND1)**, ассоциированная с LHON, была впервые описана в 1991 г. [54]. Мутация приводит к замене аланина на

треонин в 52-м положении первой субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса. Мутация выявляется примерно у 13% пациентов [40]. Была сконструирована векторная система, объединяющая ген *ND1* и часть гена *COX10*, необходимого для доставки первого в митохондрии. В клеточной линии, содержащей мутацию **m.3460G>A (MT-ND1)**, в состоянии гомоплазмии наблюдалось значительное снижение стационарной концентрации АТФ, однако после введения вектора удалось добиться практически полного восстановления исходного уровня АТФ [38].

Мутация **m.G14459G>A (MT-ND6)** также ассоциирована с LHON [55]. Для ее супрессии была использована модифицированная версия недавно открытой системы редактирования генома TALEN [56]. Белки TALEN, или TAL-эффекторные нуклеазы, специфично узнают определенную нуклеотидную последовательность ДНК (TAL-эффекторы). Такие белки сливаются с каталитическим доменом нуклеазы (например, *FokI*). После узнавания и взаимодействия TALEN с ДНК происходит разрыв цепи ДНК в месте посадки нуклеазы. Для формирования двуцепочечного разрыва ДНК используют два TALEN, каждый из которых конструируется для специфического взаимодействия с одной из комплементарных цепей ДНК. При этом места посадки TALEN на ДНК выбираются таким образом, что каталитические домены нуклеазы *FokI* формируют димер, разрезая обе цепи ДНК. На основе данного подхода были сконструированы так называемые mitoTALEN – белки, способные импортироваться в митохондрии и узнавать мтДНК. Направленной элиминации подвергались мтДНК с **m.G14459G>A (MT-ND6)**, следствием чего было не только уменьшение количества мутантной мтДНК, но и повышение активности комплекса I окислительного фосфорилирования [39].

Мутация **m.8344A>G (MT-TK)** в 80% случаях ассоциирована с миоклональной эпилепсией и рваными красными мышечными волокнами (англоязычная аббревиатура MERRF, OMIM # 545000). Мутация затрагивает ген лизиновой тРНК; для ее фенотипического проявления необходимо, чтобы уровень гетероплазмии достигал 85–90% [57]. Доставка тРНК в митохондрии имеет ряд сложностей, т.к. в норме тРНК в митохондриях млекопитающих не импортируются, а синтезируются непосредственно в матриксе органелл. Тем не менее, были успешно разработаны системы направленного транспорта гетерологических тРНК в митохондрии млекопитающих [41, 42]. Удалось показать, что модифицированная лизиновая тРНК дрожжей частично импортируется в митохондрии культуры клеток человека, содер-

жащих $m.8344A>G$ (*MT-TK*). Такая доставка частично восстанавливала работу митохондрий и, как следствие, функционирование клеток [40]. Основной проблемой данного подхода является довольно быстрая деградация трансфицируемых РНК в клетке. Работы над преодолением этой проблемы уже ведутся. В частности, было показано, что гибриды РНК–ДНК обладают значительно большей стабильностью в клетке по сравнению с РНК [58]. С другой стороны, такие гибриды характеризовались меньшим «генно-терапевтическим» эффектом. Для коррекции дефектов окислительного фосфорилирования, связанных с наличием мутации $m.8344A>G$ (*MT-TK*), была также использована химерная молекула РНК, включающая нормальный вариант лизинового тРНК с «пришитой» к ней шпилькой от РНК-компонента рибонуклеазы Р (RNase P), который в норме импортируется в митохондрии клеток человека. Наличие этой 20-нуклеотидной шпилечной структуры позволяло импортировать лизиновую тРНК в митохондрии, что способствовало восстановлению процесса окислительного фосфорилирования в клетках [43].

Мутация $m.611G>A$ (*MT-TF*) в гене митохондриальной фенилаланиновой тРНК также ассоциирована с синдромом MERFF [59]. Правильную работу митохондрий с $m.611G>A$ (*MT-TF*) удалось восстановить при помощи модификации фенилаланил-тРНК-синтетазы, в результате которой она доставляла в митохондриальные рибосомы тирозин вместо фенилаланина; при этом соответствующие аминокислотные замены практически не имели значения для функции органелл [44].

Мутация $m.3243A>G$ (*MT-TL1*) в 80% случаях ассоциирована с митохондриальной энцефалопатией с инсультоподобными эпизодами и лактат-ацидозом (англ. аббревиатура MELAS, OMIM # 540000). Эта мутация нарушает третичную структуру лейциновой тРНК, а также процессы ее метилирования, ацетилирования и тауриновой модификации антикодона, что приводит к нарушению трансляции в митохондриях [60]. Для восстановления функциональной активности трансляционного аппарата митохондрий клеток с $m.3243A>G$ (*MT-TL1*) была индуцирована гиперэкспрессия соответствующей лейцил-тРНК-синтетазы. Результатом эксперимента стало повышение уровня транслируемых белков в 3 раза [45]. Для супрессии этой же мутации группой Ванга [43] была применена стратегия с использованием гибридной РНК, как и в случае с мутацией $m.8344A>G$ (*MT-TK*). Использование такой модифицированной тРНК лизина приводило к восстановлению функцио-

нирования митохондрий в клетках. Наконец, еще одним способом супрессии этой мутации является импорт тРНК в митохондрии. Была сконструирована модифицированная дрожжевая тРНК, содержащая в своем составе естественные детерминанты импорта в митохондрии, а также детерминанты узнавания лейцил-тРНК-синтетазой. Такая тРНК действительно импортировалась в митохондрии клеток человека с мутацией $m.3243A>G$ (*MT-TL1*), что приводило к частичному восстановлению параметров митохондриальной функции [46].

Основная делеция размером 4977 п.н. (8483–13459) в англоязычной литературе носит название «common deletion» и представлена примерно у 30% пациентов с делециями мтДНК [61]. Она считается наиболее частой причиной синдрома Кернса–Сейра (англ. аббревиатура KSS, OMIM # 530000), при котором наблюдаются прогрессирующая наружная офтальмоплегия, пигментная ретинопатия и ранняя манифестация [62]. Основная делеция является частым атрибутом нормального старения клеток человека [63]. Как и в случае с $m.G14459G>A$ (*MT-ND6*), для специфической элиминации делетированной мтДНК был разработан подход mitoTALEN. Удалось добиться уменьшения количества делетированной мтДНК и значительного компенсаторного увеличения количества копий мтДНК дикого типа [39]. Используя другую систему редактирования генома, основанную на белках типа «цинковые пальцы», в клетках с изначальным уровнем гетероплазмии по основной делеции 85% удалось добиться уменьшения количества мутантной мтДНК до 24%. Кроме того, в «исцеленных» клетках наблюдали значительное увеличение скорости потребления кислорода [34]. Помимо этого, для супрессии данной мутации был также применен подход, основанный на импорте гетерологических РНК из цитозоля. Было показано, что искусственные короткие РНК, содержащие в своем составе специальную шпильку, импортируются в митохондрии клеток человека с эффективностью, в несколько раз превышающую таковую в случае модифицированных дрожжевых тРНК [64]. Более того, в этой же работе было показано, что добавление в такие РНК нескольких десятков нуклеотидов, не препятствующих образованию шпильки, никак не сказывается на эффективности импорта этих молекул в митохондрии. Этот факт был использован исследователями для создания молекул РНК, содержащих детерминанты импорта, а также последовательности нуклеотидов, комплементарные участку мтДНК, образуемому в результате основной делеции. Было показано, что такие РНК селективно свя-

зываются с мутантными мтДНК и препятствуют их репликации, что приводит к снижению гетероплазмии и частичному восстановлению митохондриальной функции [47].

Генетика митохондрий человека в своем развитии привела к формированию отдельного направления — митохондриальной медицины [65]. Коррекция мутаций мтДНК имеющимися генно-терапевтическими подходами обычно проходит значительно труднее, чем коррекция наследственных болезней ядерной этиологии. Разработанные к настоящему времени методы, однако, сложно сравнить по эффективности в силу использования различных стратегий и выбранной модельной системы. Комплексность клинической картины митохондриальных болезней затрудняет их дифференциальную диагностику. В связи с этим наблюдается явная недооценка встречаемости этого класса патологий. Если диагноз все же был поставлен, важно выработать адекватный курс лечения, отвечающий современным представлениям о молекулярном патогенезе митохондриальной болезни. Поскольку экспериментальные стратегии редактирования мтДНК находятся на ранней стадии развития, большое значение приобретают традиционное медикаментозное лечение и хирургическое вмешательство. Используемые в клинической практике стратегии симптоматического лечения включают применение фармакологических средств, специальных диет, а также физических нагрузок [66]. Хирургическое вмешательство применяется для установки улитковых имплантатов при синдромах MELAS и KSS. Нарушение проводимости сердца при

KSS можно компенсировать вживлением водителя ритма [67]. Достижения в области микроманипулирования клеточными органеллами позволили разработать методику пересадки пронуклеусов оплодотворенной яйцеклетки с дефектными митохондриями в предварительно энуклеированную яйцеклетку с нормально функционирующими митохондриями [68]. Тем не менее, при использовании такого подхода возникает множество этических вопросов, которые пока не получили адекватного разрешения [69].

К настоящему моменту представляется очевидным, что исследования структуры мтДНК и разработка способов супрессии ее мутаций имеют огромное фундаментальное и прикладное значение. Хотя о внедрении таких способов в клиническую практику речь еще не идет, в последние годы наблюдается значительный прогресс в данной области, сопровождающийся все возрастающим интересом научного сообщества к этой тематике. Таким образом, можно надеяться, что через какое-то время генно-терапевтические способы лечения митохондриальных болезней все же найдут свое применение в практике.

Авторы глубоко признательны всем сотрудникам своих лабораторий в Калининграде и Москве за помощь в написании данной работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (соглашения 14.BVV.21.0089 и 14.604.21.0113) и РФФИ (гранты 12-04-00001 и 12-04-93105).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naviaux, R.K. (2004) Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease, *Mitochondrion*, **4**, 351–361.
2. Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B. (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study, *J. Clin. Invest.*, **41**, 1776–1804.
3. DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M., and DeVivo, D.C. (1985) Mitochondrial myopathies, *Ann. Neurol.*, **17**, 521–538.
4. Nass, S., and Nass, M.M. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments, *J. Cell Biol.*, **19**, 613–629.
5. Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., and Attardi, G. (1982) Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7195–7199.
6. Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Shurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J. 2nd., and Nikoskelainen, E.K. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy, *Science*, **242**, 1427–1430.
7. Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies, *Nature*, **331**, 717–719.
8. DiMauro, S. (2011) A history of mitochondrial diseases, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 261–276.
9. Spelbrink, J.N. (2010) Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges, *IUBMB Life*, **62**, 19–32.
10. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. (1981) Sequence and organi-

- zation of the human mitochondrial genome, *Nature*, **290**, 457–465.
11. Lightowlers, R.N., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., and Howell, N. (1997) Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease, *Trends Genet.*, **13**, 450–455.
 12. Chinnery, P.F., Howell, N., Lightowlers, R.N., and Turnbull, D.M. (1998) Genetic counseling and prenatal diagnosis for mtDNA disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 1908–1911
 13. Cummins, J.M. (2000) Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome, *Hum. Reprod.*, **15**, 92–101.
 14. Schwartz, M., and Vissing, J. (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA, *N. Engl. J. Med.*, **347**, 576–580.
 15. Wonnapijit, P., Chinnery, P.F., and Samuels, D.C. (2008) The distribution of mitochondrial DNA heteroplasmy due to random genetic drift, *Am. J. Hum. Genet.*, **83**, 582–593.
 16. Gilkerson, R.W., and Schon, E.A. (2008) Nucleoid autonomy: an underlying mechanism of mitochondrial genetics with therapeutic potential, *Commun. Integr. Biol.*, **1**, 34–36.
 17. Dean, N.L., Battersby, B.J., Ao, A., Gosden, R.G., Tan, S.L., Shoubridge, E.A., and Molnar, M.J. (2003) Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases, *Mol. Hum. Reprod.*, **9**, 631–638.
 18. de Laat, P., Koene, S., Heuvel, L.P., Rodenburg, R.J., Janssen, M.C., and Smeitink, J.A. (2013) Inheritance of the m.3243A>G mutation, *JIMD Rep.*, **8**, 47–50.
 19. Shoubridge, E.A., and Wai, T. (2007) Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte, *Curr. Top Dev. Biol.*, **77**, 87–111.
 20. Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2010) The mitochondrial proteome and human disease, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **11**, 25–44.
 21. Harbauer, A.B., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2014) The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease, *Cell Metab.*, **4**, 357–372.
 22. Wang, J., Schmitt, E.S., Landsverk, M.L., Zhang, V.W., Li, F.Y., Graham, B.H., Craigen, W.J., and Wong, L.J. (2012) An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience, *Genet. Med.*, **14**, 620–626.
 23. DiMauro, S., and Schon, E.A. (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease, *Am. J. Med. Genet.*, **106**, 18–26.
 24. Bosley, T.M., and Abu-Amero, K.K. (2010) Assessing mitochondrial DNA nucleotide changes in spontaneous optic neuropathies, *Ophthalmic. Genet.*, **31**, 163–172.
 25. Schiff, M., Benit, P., Jacobs, H.T., Vockley, J., and Rustin, P. (2012) Therapies in inborn errors of oxidative metabolism, *Trends Endocrinol. Metabol.*, **23**, 488–495.
 26. Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J., and Schon, E.A. (2002) Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus, *Nature Genet.*, **30**, 394–399.
 27. Kaltimbacher, V., Bonnet, C., Lecoivre, G., Forster, V., Sahel, J.A., and Corral-Debrinski, M. (2006) mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein, *RNA*, **12**, 1408–1417.
 28. Bonnet, C., Kaltimbacher, V., Ellouze, S., Augustin, S., Benit, P., Forster, V., Rustin, P., Sahel, J.A., and Corral-Debrinski, M. (2007) Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or v subunits, *Rejuvenation Res.*, **10**, 127–144.
 29. Ojaimi, J., Pan, J., Santra, S., Snell, W.J., and Schon, E.A. (2002) An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3836–3844.
 30. Tanaka, M., Borgeld, H.J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J.S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., Shamoto, M., Fuku, N., Kurata, M., Yamada, Y., Nishizawa, K., Akao, Y., Ohishi, N., Miyabayashi, S., Umemoto, H., Muramatsu, T., Furukawa, K., Kikuchi, A., Nakano, I., Ozawa, K., and Yagi, K. (2002) Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria, *J. Biomed. Sci.*, **9**, 534–541.
 31. Alexeyev, M.F., Venediktova, N., Pastukh, V., Shokolenko, I., Bonilla, G., and Wilson, G.L. (2008) Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes, *Gene Ther.*, **15**, 516–523.
 32. Bacman, S.R., Williams, S.L., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2010) Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease, *Gene Ther.*, **17**, 713–720.
 33. Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P., and Klug, A. (2006) Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19689–19694.
 34. Gammage, P.A., Rorbach, J., Vincent, A.I., Rebar, E.J., and Minczuk, M. (2014) Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations, *EMBO Mol. Med.*, **6**, 458–466.
 35. Guy, J., Qi, X., Pallotti, F., Schon, E.A., Manfredi, G., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hauswirth, W.W., and Lewin, A.S. (2002) Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy, *Ann. Neurol.*, **52**, 534–542.
 36. Yu, H., Koilkonda, R.D., Chou, T.H., Porciatti, V., Ozdemir, S.S., Chiodo, V., Boye, S.L., Boye, S.E., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., and Guy, J. (2012) Gene delivery to mitochondria by targeting modified adeno-associated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1238–1247.
 37. Park, J.S., Li, Y.F., and Bai, Y. (2007) Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1772**, 533–542.
 38. Bonnet, C., Augustin, S., Ellouze, S., Benit, P., Bouaita, A., Rustin, P., Sahel, J.A., and Corral-Debrinski, M. (2008) The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1707–1717.
 39. Bacman, S.R., Williams, S.L., Pinto, M., Peralta, S., and Moraes, C.T. (2013) Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs, *Nature Med.*, **19**, 1111–1113.
 40. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Lightowlers, R.N., Martin, R.P., and Tarasov, I. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells, *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2519–2534.
 41. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P., and Tarasov, I.A. (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm, *Science*, **289**, 1931–1933.

42. Tarassov, I., Kamenski, P., Kolesnikova, O., Karicheva, O., Martin, R.P., Krashennikov, I.A., and Entelis, N. (2007) Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation, *Cell Cycle*, **6**, 2473–2477.
43. Wang, G., Shimada, E., Zhang, J., Hong, J.S., Smith, G.M., Teitell, M.A., and Koehler, C.M. (2012) Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4840–4845.
44. Ling, J., Yadavalli, S.S., and Ibba, M. (2007) Phenylalanyl-tRNA synthetase editing defects result in efficient mistranslation of phenylalanine codons as tyrosine, *RNA*, **13**, 1881–1886.
45. Park, H., Davidson, E., and King, M.P. (2008) Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene, *RNA*, **14**, 2407–2416.
46. Karicheva, O.Z., Kolesnikova, O.A., Schirtz, T., Vysokikh, M.Y., Mager-Heckel, A.M., Lombis, A., Boucheham, A., Krashennikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2011) Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8173–8186.
47. Comte, C., Tonin, Y., Heckel-Mager, A.M., Boucheham, A., Smirnov, A., Aure, K., Lombes, A., Martin, R.P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2013) Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 418–433.
48. Schon, E.A., Santra, S., Pallotti, F., and Girvin, M.E. (2001) Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis, *Sem. Cell Dev. Biol.*, **12**, 441–448.
49. Solaini, G., Harris, D.A., Lenaz, G., Sgarbi, G., and Baracca, A. (2008) The study of the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 941–945.
50. Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K., and Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy, *Am. J. Hum. Genet.*, **46**, 428–433.
51. Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., Clarke, J.T., Wherret, J., Smith, C., Rudd, N., Petrova-Benedict, R., and Robinson, B.H. (1992) Heteroplasmic mtDNA mutation (T—G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high, *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 852–858.
52. Bacman, S.R., Williams, S.L., Duan, D., and Moraes, C.T. (2012) Manipulation of mtDNA heteroplasmy in all striated muscles of newborn mice by AAV9-mediated delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease, *Gene Ther.*, **19**, 1101–1106.
53. Sadun, A.A., La Morgia, C., and Carelli, V. (2011) Leber's hereditary optic neuropathy, *Curr. Treat Options Neurol.*, **13**, 109–117.
54. Huoponen, K., Vilkkilä, J., Aula, P., Nikoskelainen, E.K., and Savontaus, M.L. (1991) A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy, *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 1147–1153.
55. Jun, A.S., Trounce, I.A., Brown, M.D., Shoffner, J.M., and Wallace, D.C. (1996) Use of transmitochondrial cybrids to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA-encoded NADH dehydrogenase subunit 6 gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 771–777.
56. Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e82.
57. Silvestri, G., Ciafaloni, E., Santorelli, F.M., Shanske, S., Servidei, S., Graf, W.D., Sumi, M., and DiMauro, S. (1993) Clinical features associated with the A—>G transition at nucleotide 8344 of mtDNA («MERRF mutation»), *Neurology*, **43**, 1200–1206.
58. Tonin, Y., Heckel, A.M., Dovydenko, I., Meschaninova, M., Comte, C., Venyaminova, A., Pyshnyi, D., Tarassov, I., and Entelis, N. (2014) Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA, *Biochimie*, **100**, 192–199.
59. Mancuso, M., Filosto, M., Mootha, V.K., Rocchi, A., Pistolesi, S., Murri, L., DiMauro, S., and Siciliano, G. (2004) A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome, *Neurology*, **62**, 2119–2121.
60. Suzuki, T., Nagao, A., and Suzuki, T. (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases, *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 299–329.
61. Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M., and DiMauro, S. (1989) A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA, *Science*, **244**, 346–349.
62. Maceluch, J.A., and Niedziela, M. (2006) The clinical diagnosis and molecular genetics of Kearns-Sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy, *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, **4**, 117–137.
63. Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Beal, M.F., and Wallace, D.C. (1992) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age, *Nature Genet.*, **2**, 324–329.
64. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R.P., Tarassov, I., and Entelis, N. (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria, *RNA*, **16**, 926–941.
65. DiMauro, S. (2004) Mitochondrial medicine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1659**, 107–114.
66. Pfeffer, G., Horvath, R., Klopstock, T., Mootha, V.K., Suomalainen, A., Koene, S., Hirano, M., Zeviani, M., Bindoff, L.A., Yu-Wai-Man, P., Hanna, M., Carelli, V., McFarland, R., Majamaa, K., Turnbull, D.M., Smeitink, J., and Chinnery, P.F. (2013) New treatments for mitochondrial disease—no time to drop our standards, *Nature Rev. Neurol.*, **9**, 474–481.
67. Footitt, E.J., Sinha, M.D., Raiman, J.A., Dhawan, A., Moganandram, S., and Champion, M.P. (2008) Mitochondrial disorders and general anaesthesia: a case series and review, *Br. J. Anaesth.*, **100**, 436–441.
68. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J., Sanchis, D.M., Ma, H., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Kang, E., Lee, H.S., Ramsey, C., Masterson, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R., and Mitalipov, S. (2013) Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases, *Nature*, **493**, 627–631.
69. Bredenoord, A.L., Dondorp, W., Pennings, G., and De Wert, G. (2011) Ethics of modifying the mitochondrial genome, *J. Med. Ethics*, **37**, 97–100.

**MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS
AND APPROACHES FOR THEIR CORRECTION****M. V. Patrushev^{1,2}, P. A. Kamenski^{1,2*},
I. O. Mazunin^{2*}**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Leninsky Gory 1/12, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309,
E-mail: peter@protein.bio.msu.ru*

² *Immanuel Kant Baltic Federal University, ul. Alexandra Nevskogo 14,
Kaliningrad 236038, Russia; fax: +7(4012)595-595,
E-mail: IMazunin@kantiana.ru*

Received March 31, 2014

Revision received August 14, 2014

Apart from the nucleus, the mitochondrion is the only organelle of an animal cell that contains its own genome. Mitochondrial DNA is much less in size than the nuclear DNA and codes for only several dozens of biological macromolecules. Nevertheless, mutations in mitochondrial genes often result in the occurrence of serious hereditary neuromuscular diseases. New mitochondrial DNA mutations and their relations to clinical symptoms are continuously reported in the scientific literature. In the present review, we summarize all existing data about such mutations, and also about gene therapy approaches for their suppression.

Key words: mitochondrial genome, mitochondrial DNA, mutations, mitochondrial diseases, gene therapy