

РНК-редактирование

Е. Мерзляк



Екатерина Мерзляк
14-й выпуск биокласса
(Вирусы), школа № 520
(1993 г.), закончила кафед-
ру молекулярной биологии
Биофака МГУ (1998 г.),
к.б.н., с 2004 г. работает в
биотехнологической фирме
«Евроген»*,
ekaterin99@mail.ru

Когда люди начинают изучать молекулярную биологию, то возникает ощущение, что по большому счету все уже открыто. Существует центральное положение, сформулированное Уотсоном и Криком, об однозначном переносе информации, закодированной в ДНК, на молекулу-переносчик — мРНК, после чего мРНК транслируется, и получается белок. Однако, как оказалось, эта схема не является столь однозначной и сильно усложнилась в последние годы.

Первым наблюдением, которое привело к изменению схемы ДНК → РНК → белок, можно считать открытие некодирующих последовательностей внутри кодирующих, т.е. открытие экзон-интронной структуры гена и, соответственно, явления РНК-сплайсинга. Далее необходимо отметить открытие РНК-редактирования, которое заключается во вставке и делеции уридиловых оснований в митохондриях простейших, относящихся к отряду Kinetoplastida. Оба этих наблюдения, по мнению самого Уотсона, принципиально изменили основную догму молекулярной биологии.

Еще одним удивительным открытием последних лет можно считать явление белкового сплайсинга, когда из пре-белка без участия каких-либо факторов вырезается определенный участок. По аналогии с РНК-сплайсингом, вырезаемые участки белка были названы инте-

ины, а те, которые сшиваются, — экстеины. Явление белкового сплайсинга было показано на дрожжах.

В этой статье я хочу рассказать о явлении РНК-редактирования. Оказалось, что РНК-редактирование отнюдь не уникальное явление и встречается практически во всех группах организмов. Стоит отметить, что на данный момент под термином «РНК-редактирование» понимают любое изменение мРНК по сравнению с ДНК, поэтому механизмы, которые лежат в основе этого процесса, разные. Редактированию подвергаются транскрипты, которые считываются как с ядерного, так и с пластидных (митохондриального и хлоропластных) геномов.

Значение процесса редактирования для жизнедеятельности организмов не подлежит сомнению. Так, в случае простейших, относящихся к семейству Trypanosomatidae, попытки вывести линии, у которых отсутствовали бы белки редактирующего комплекса, не увенчались успехом. Видимо, белки этого комплекса оказываются необходимыми для выживания и ничем не могут быть заменены.

Для насекомых РНК-редактирующие белки не столь жизненно необходимы. Мухи *Drosophila*, у которых полностью отсутствует фермент редактирующего комплекса dADAR, выживают. Однако у них наблюдаются серьезные расстройства нервной системы. Для 30-дневных мух характерно долгое пребывание в неактивном отдыхе, в периоды которого они лежат на спине. К 50-му дню у мух постоянно подняты крылья, часто встречаются асимметричные позы с одним поднятым крылом и ногой.

В большей части описанных примеров роль редактирования заключается в увеличении количества различных форм того или иного белка. Так, например, в гене *sacophony*, кодирующем белок кальциевого канала нервных клеток *Drosophila*, показано 10 сайтов редактирования. Таким образом, сочетание разных отредактированных сайтов может давать более 1000 различных белковых продуктов, и это не считая сплайсинга.

Однако роль редактирования не всегда столь однозначна. Так, известны примеры, когда этот процесс происходит в некодирующих областях: интронах, а также в 5'- и 3'-нетранслируемых регионах.

* В 1998–2002 гг. училась в аспирантуре и работала на кафедре молекулярной биологии Биофака МГУ. Кандидатская диссертация посвящена изучению редукции процесса редактирования у низших трипаносоматид. Сейчас занимается разработкой киназных сенсоров на основе зеленого флуоресцентного белка.

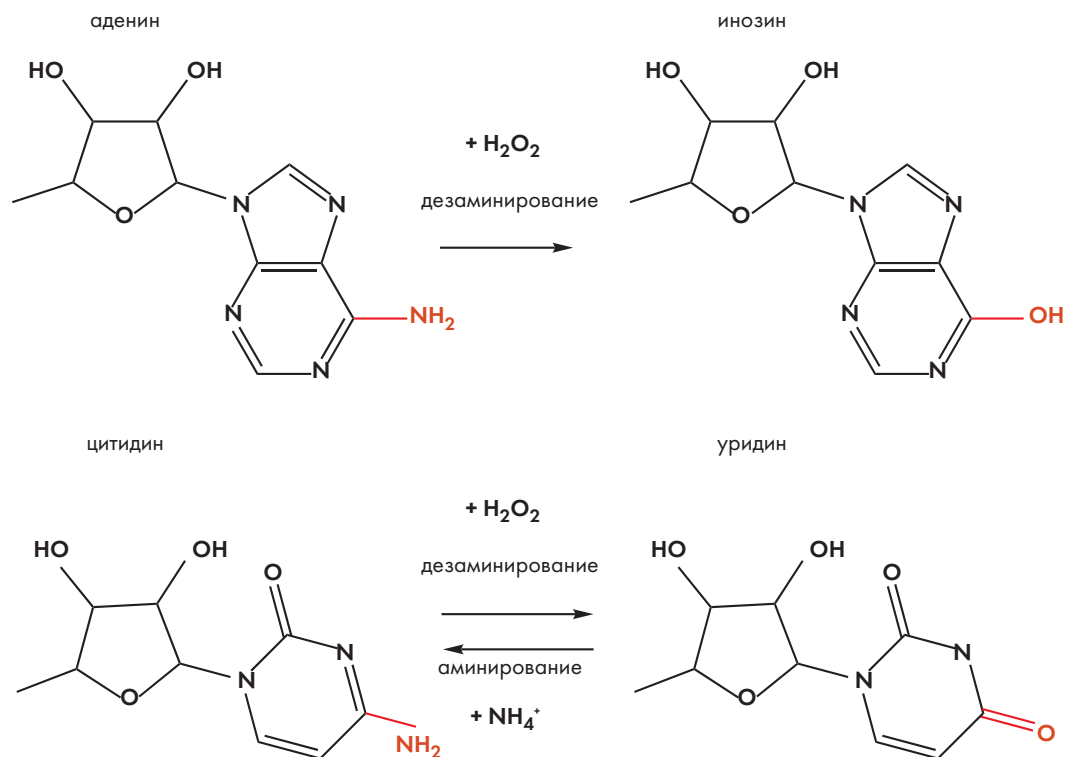


Рисунок 1. Схема реакций дезаминирования оснований мРНК, в результате которых под действием определенных ферментов аденин (А) превращается в инозин (И), а цитидин (С) — в уридин (У).

Разнообразие процесса редактирования

В настоящее время известно два основных типа редактирования.

1. Изменение нуклеотидного состава мРНК за счет модификации оснований во время или после транскрипции. В основном в этом случае речь идет о нуклеотидной конверсии. Например, в транскрипте белка — переносчика липидов аполипопротеина В (Аро-В) у млекопитающих происходит превращение цитидилового основания (С) в уридиловое (U) за счет удаления аминогруппы (дезаминирования); либо дезаминирование аденилового основания (А) приводит к появлению инозинового (I). При трансляции I в кодоне распознается как G (рисунок 1).

2. Изменение последовательности мРНК за счет вставки или вырезания определенного нуклеотида. Примером такого типа редактирования может быть вставка цитидиловых оснований (С) у миксомицета *Physarum polycephalum* или уридиловых оснований (U) у жгутиковых простейших, трапаносоматид. В данной группе общего механизма нет, в каждом случае за этот процесс отвечает своя группа ферментов.

Рассмотрим различные примеры, отражающие особенности процессов редактирования разного типа и их регуляторные функции.

Редактирование ядерных транскриптов

В ядрах клеток кишечника человека было показано сайт-специфическое дезаминирование мРНК аполипопротеина (Аро-В). Оказалось, что этот белок существует в двух формах и экспрессируется в двух типах тканей: «короткая» форма (Аро-В48) — в эпителиальных клетках кишечника, а «длинная» (Аро-В100) — в гепатоцитах. При этом, «короткая» форма является укороченной с С-конца производной «длинного» белка. При дезаминировании одного из цитидинов кодон САА, кодирующий аминокислотный глутаминовый остаток, превращается в UАА — стоп-кодон, останавливающий синтез белка на РНК-матрице. Аро-В48 входит в состав хиломикрон (хиломикроны — липопротеиновые комплексы, в составе которых жиры из эпителия тонкого кишечника через кровь попадают в организм). Хиломикроны на 90% состоят из триглицеридов. Аро-В100 входит в состав других липопротеиновых комплексов ЛОНП (липопротеины очень низкой плотности), которые секретирует печень в ответ на разные стимулы. Жировой состав этих частиц отличается от хиломикрон, ЛОНП на 50% состоит из холестерина и всего на 10% из триглицеридов. Таким образом, оба белка способны переносить триглицериды, а за связыва-

ние с холестерином отвечает именно С-конец белка, который отсутствует в случае Аро-В48.

В ядрах нейронов млекопитающих мРНК, кодирующая субъединицу глутаматного рецептора, также подвергаются редактированию. При этом глутаминовый кодон CAG превращается в аргининовый — CGG. Интересно отметить, что у пресноводных рыб изначально закодирован в геноме именно аргинин. У млекопитающих редактирование проходит не на 100%, поэтому рецептор состоит из комбинации отредактированных и неотредактированных субъединиц, — этим достигается различная чувствительность молекул рецептора к потоку ионов Ca^{2+} . И такое сочетание, по-видимому, необходимо для нормальной работы организма млекопитающего. Об этом говорит то, что мыши, у которых все рецепторы содержали в указанном положении глутамин, страдали ранней формой эпилепсии и быстро умирали.

С неправильной работой РНК-редактирующей системы могут быть связаны и заболевания человека. У людей, страдающих болезнью Альцгеймера, хореей Хантингтона и некоторыми формами шизофрении, показано практически полное отсутствие отредактированных мРНК этого гена.

Редактирование транскриптов органелл

Этот тип посттранскрипционного редактирования обнаружен в митохондриях и хлоропластах высших растений, при этом у семенных растений чаще встречается конверсия С в U, а у споровых как «С → U», так и «U → С» конверсии являются частыми и практически равновероятными. Обычно конверсия подвергается вторая позиция кодона. Описаны случаи, когда стоп-кодны внутри рамки считывания редактируются с образованием глутаминового или аргининового кодонов, и белок в итоге получается длиннее. Чаще этот тип редактирования происходит в экзоне, хотя может быть и в интроне. Почти все митохондриальные гены подвергаются редактированию, и таких точек может насчитываться до 1000 в одном гене. В хлоропластах это явление более редкое — до 50 сайтов в одном гене. Редактирование найдено даже в мутантных хлоропластах ячменя, в которых почти полностью отсутствуют рибосомы. Эти данные могут свидетельствовать о том, что все белки, участвующие в редактировании, приходят из цитоплазмы, и, следовательно, имеют ядерное кодирование. Таким образом, этот процесс, происходящий в данном случае в полуавтономной в генетическом отношении

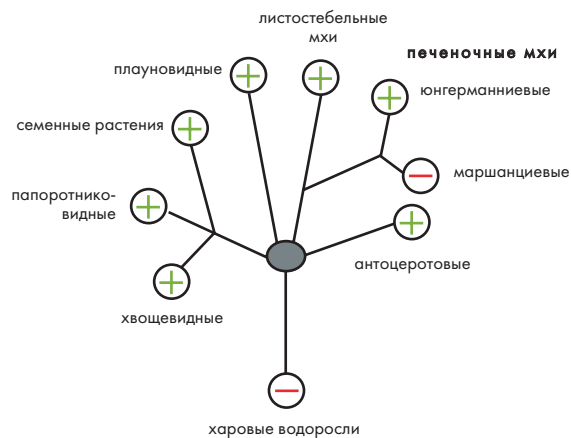


Рисунок 2. Наличие редактирования в разных группах Plantae.

(+) — наличие редактирования в этой группе, (-) — отсутствие редактирования, соотнесенные с филогенетическим деревом. Заштрихованный овал обозначает узел, в котором появилось редактирование. Однако, видно, что у одной из групп мхов — маршанциевые — редактирование отсутствует.

клеточной органелле — хлоропласте, находится под контролем ядерного генома. Редактирование в растениях происходит, видимо, по-разному в разных органоидах. Когда митохондриальную мРНК с потенциальными сайтами редактирования удалось ввести в хлоропласты тех же растений, превращения нуклеотидов не произошло.

Интересен пример возможной роли редактирования в регуляции транскрипции хлоропластного генома табака. Нуклеотидная замена С на U в мРНК приводит к аминокислотной замене серина на лейцин в α -субъединице РНК-полимеразы (groA). Причем, в хлоропластах других растений, а также в геноме эубактерий, на этом месте закодирован именно лейцин.

Исследование роли индивидуальных аминокислот α -субъединицы РНК-полимеразы бактерии *E. coli* показало, что расположение лейцина в этой позиции важно для активации транскрипции из-за его связи с белками—регуляторами транскрипции. При анализе транскриптов было показано, что 70% из них отредактированы. Предполагается, что существует два типа альтернативных белков, причем белки, полученные с неотредактированной матрицы, не способны связываться с регуляторными белками, в отличие от белка, в котором замена произошла.

Считается, что у растений количество сайтов редактирования в хлоропластных генах обратно пропорционально эволюционной продвинутости организмов. Так, для хлоропластного гена, кодирующего β субъединицу АТФазы *atpb*, число сайтов редактирования уменьшается в ряду: мох *Anthoceros formosae* (29 сайтов), папоротник *Angiopteris* (3 сайта), сосна *Pinus*



Рисунок 3. Фотография мазка крови носителя *Trypanosoma cruzi*.

(1 сайт); а у покрытосеменных растений сайты редактирования полностью отсутствует. Аналогичная тенденция наблюдается и при анализе митохондриальных транскриптов, однако она не столь значительна. Предполагают, что процесс редактирования возник в хлоропластах и митохондриях растений, вышедших на сушу (так как он отсутствует у зеленой водоросли *Chara*), а далее постепенно редуцировался до полного исчезновения у покрытосеменных (см. рисунок 2).

РНК-редактирование у трипаносоматид

Одной из самых интригующих систем, где РНК-редактирование играет чуть ли не основную роль в реализации митохондриального генома, является группа паразитических простейших, относящаяся к отряду Kinetoplastida, включающего и семейство Trypanosomatidae. У этих организмов процесс редактирования заключается в посттранскрипционной вставке, либо в вырезании уридилловых остатков из пре-мРНК.

Жгутиковые простейшие, относящиеся к семейству Trypanosomatidae, являются возбудителями тяжелых заболеваний человека (например сонная болезнь, болезнь Чагаса и кожные и висцеральные лейшманиозы), скота и растений (рисунок 3), переносчиком являются насекомые (в частности сонную болезнь переносит муха цеце, болезнь Чагаса клопы рода *Triatoma*).

Первый пример такого типа модификации митохондриальной РНК был описан Бенне в 1986 г. (Benne, 1986). Этот процесс был открыт при изучении структуры митохондриального генома (кинетопластной ДНК=кпДНК) трипаносоматид. Митохондриальный геном трипаносоматид крайне велик и виден при цитологическом окрашивании красителями на ДНК даже в световом микроскопе. На электронной микрофотографии видно, какую большую часть митохондрии занимает кпДНК (рисунок 4). Четко выраженное скопление ДНК в определенном месте митохондрии (кинетопласте) является характерным для всего отряда Kinetoplastida.

Кинетопластная ДНК этих простейших состоит из двух типов молекул ДНК макси-

(20–40 т.п.о. (тысяч пар оснований)) и миниколец (0,45–8 т.п.о.). Количество этих молекул отличается на порядки: 20–50 максиколец и до 10^3 – 10^4 миниколец. Эти молекулы образуют плотную сеть.

В начале 1980-х гг. при попытке определить первичную структуру максикольца *Trypanosoma brucei* не было показано ни одной открытой рамки считывания, которая не прерывалась бы стоп-кодонами (это значит, что ни один нормальный белок с такой мРНК считываться не мог). Это показалось крайне странным обстоятельством, так как к этому времени было известно, что митохондриальная ДНК обычно кодирует белки дыхательной цепи. При тщательном изучении этих последовательностей было обнаружено, что для восстановления открытой рамки считывания в гене цитохром-оксидазы II-ой субъединицы (СОII) необходима вставка 4-х уридилловых остатков (U). Это и явилось первым указанием на существование столь необычного процесса — уридиллового редактирования. Далее было показано, что практически для всех митохондриальных генов, для 12 из 18 в случае *Trypanosoma brucei*, необходима вставка, либо делеция U. Число таких сайтов в одном гене может достигать нескольких десятков, а количество таких U может составлять несколько сотен. По характеру редактирования митохондриальные гены у разных трипаносоматид могут быть разделены на 3 типа: полностью или пан-редактируемые, частично редактируемые (чаще всего редактирование у таких генов подвергается 5'-концевая область) и нередатируемые гены. Считается, что у более поздно дивергировавших видов процесс редактирования затрагивает все меньшее количество генов, а в максикольце закодированы гены, соответствующие отредактированным транскриптам. Это ситуация схожа с уменьшением редактируемых сайтов в хлоропластном и митохондриальном геномах растений (см. выше).

Многими авторами были предприняты попытки описания механизма процесса уридиллового редактирования. Одними из первых поя-



Рисунок 4. Электронная микрофотография митохондрии *Trypanosoma sp.*

кпДНК — кинетопластная ДНК, плотная сеть, образованная сцепленными максими- и миниколецевыми молекулами ДНК. К митохондрии плотно подходит базальное тело жгутика.

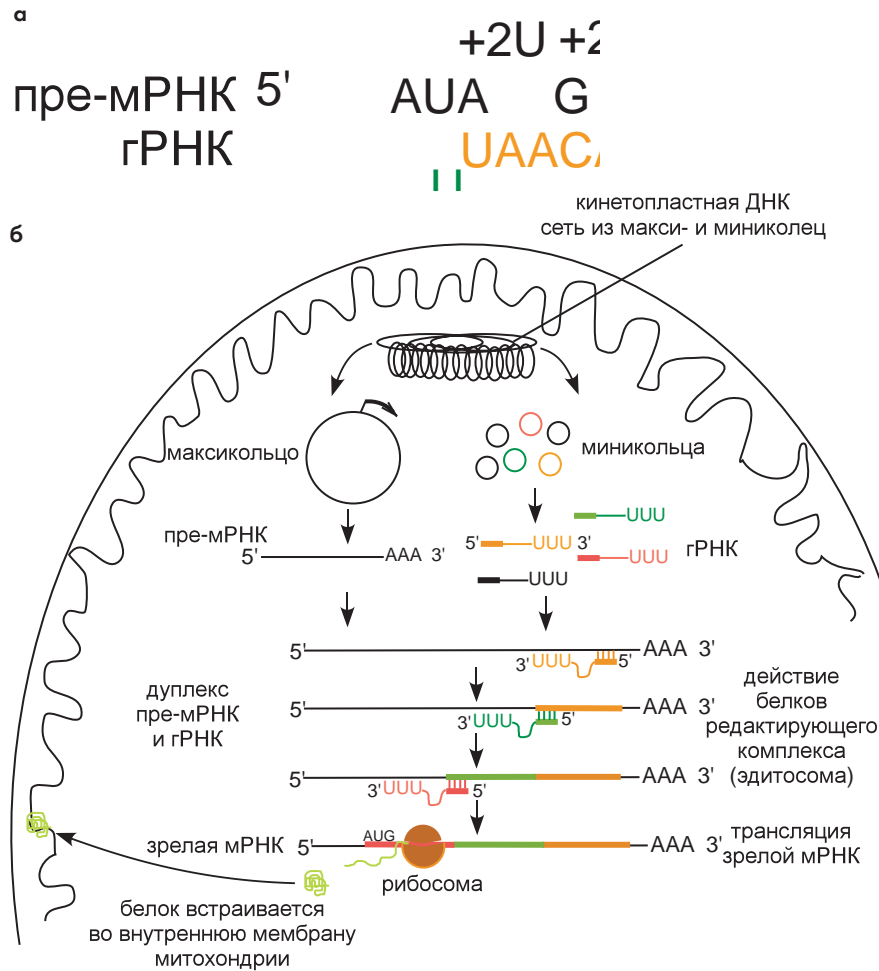


Рисунок 5. (а) — Схема строения гРНК. (б) — Схема РНК-редактирования у трипаносоматид (по Madison-Antenucci et al., 2002).
Сверху представлена кпДНК (сеть молекул ДНК: мини- и максиколец). Максикольца являются матрицей для пре-мРНК, собственно подвергающиеся редактированию, миникольца — гРНК, которые являются матрицей для этого процесса.

вились свидетельства о 3'→5' направленности этого процесса по пре-мРНК, а также существовании матрицы, которая определяет место (сайт) редактирования, где произойдет вставка/делеция U. Такого рода матрицами оказались малые РНК митохондриального кодирования, так называемые гидовые РНК (гРНК). Размер этих молекул составляет 50–80 нуклеотидов. Это открытие определило функцию миниколец, которая до этого оставалась неясной. Именно в них оказалось закодировано большинство гРНК, необходимых для редактирования (рисунок 5а,б).

В структуре гРНК можно выделить три элемента (от 5'- к 3'- концу): якорный конец (20 нуклеотидов), который полностью комплементарен участку пре-мРНК, собственно редактирующий домен (35–40 нуклеотидов) и поли-U хвост (4–15 нуклеотидов). Поли-U хвост не закодирован в ДНК, а добавляется за счет работы TUTазы (терминальной уридил трансферазы), аналогично тому, как добавляется поли-A хвост к мРНК у эукариот (рисунок 5а).

До последнего времени оставался открытым вопрос о механизме процесса редактирования у

трипаносоматид. Однако недавно удалось реконструировать этот процесс *in vitro*. Уридиловое редактирование включает в себя поэтапное действие трех ферментов. Его можно представить в виде схемы, показанной на рисунке 6. Для чего же нужен столь сложный механизм восстановления кодирующей последовательности? На данном этапе нет однозначного мнения, однако существует теория, объясняющая существование этого явления. Она заключается в том, что редактирование является регуляторным механизмом, позволяющим адаптивно менять метаболизм паразитов в зависимости от окружающих условий. В данном случае идет регуляция клеточного дыхания. Следует напомнить, что речь идет о восстановлении кодирующей последовательности мРНК митохондриальных генов. В своем жизненном цикле эти простейшие сменяют двух хозяев и должны иметь по крайней мере две программы, обеспечивающие различный уровень обмена веществ в зависимости от того, в каком хозяине он пребывает. В клетках крови млекопитающих, где вынуждены существовать кровяные паразиты, дыхательная цепь паразита отключена, а необходимую для жизне-



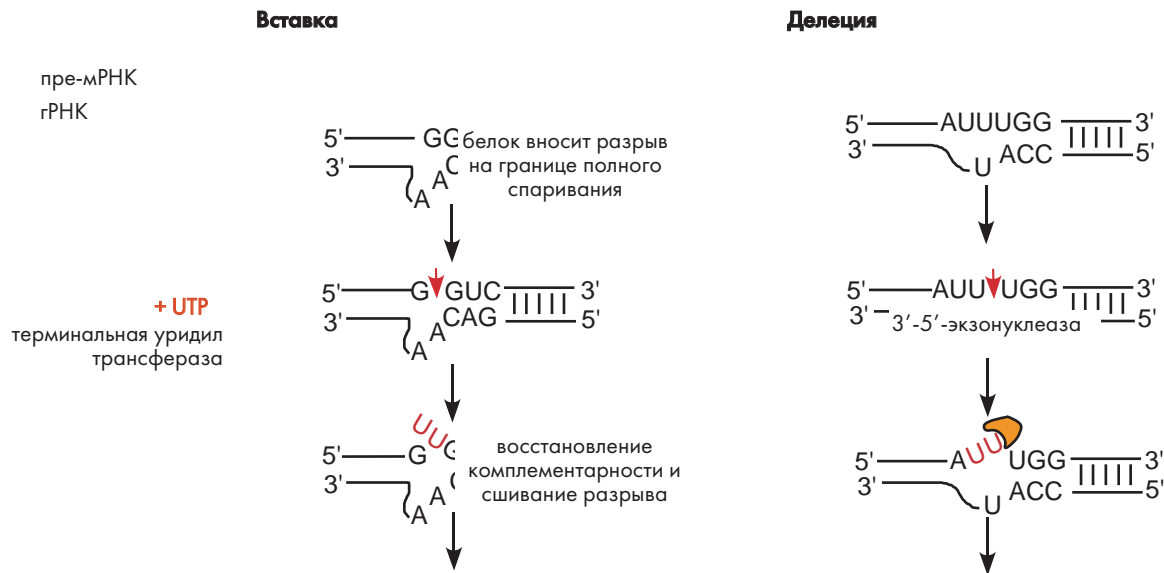


Рисунок 6. Схема редактирования — модель ферментативного каскада (по Madison-Антелуппи *et al.*, 2002).

Пре-мРНК изображена в каждом отдельном рисунке вверху, гРНК — внизу. В обоих случаях и во вставке и в делеции по окончании дуплекса эндонуклеаза вносит разрыв в пре-мРНК. Далее под действием TUTазы или экзонуклеазы происходит достройка либо отрезание U до восстановления комплементарности в дуплексе. На третьем этапе происходит сшивание разрыва в пре-мРНК. После этого последовательность событий может повториться снова до тех пор, пока вся пре-мРНК не будет полностью отредактирована.

деятельности энергию вырабатывает специальный органоид, описанный только у этих простейших, — гликосома. Процесс гликолиза не очень эффективен по сравнению с дыханием, но избыток в крови глюкозы делает его достаточным для обеспечения потребностей клетки. Редактирование — процесс достаточно «дорогой» для клетки, так как для его осуществления, как мы знаем, нужен целый комплекс белков и гРНК. В клетках эпителия кишечника насекомых, наоборот, глюкозы мало, и дыхательная цепь в митохондриях паразита активно работает. Другой фактор, который может участвовать в переключении метаболизма паразита, — это кислород. Возможно, в клетках крови происходит конкуренция за кислород между хозяйской клеткой и паразитом. Известно, что недостаток кислорода может ингибировать дыхательную цепь. В клетках эпителия кишечника насекомых, наоборот, кислорода достаточно, и дыхание протекает активно. Белки редактирующего комплекса имеют ядерное кодирование, таким образом, регуляция (наличие или отсутствие отредактированных мРНК) находится под контролем ядра.

Еще одной возможной функцией редактирования может быть формирование отредактированных мРНК с различной аминокислотной последовательностью. Такие транскрипты нам удалось идентифицировать при анализе кДНК гена 6-й субъединицы АТФазы (А6). Этот ген

тоже закодирован в митохондриях и подвергается частичному 5'-концевому редактированию. Для получения полноразмерной отредактированной мРНК необходимо три гРНК. Было показано, что существуют по крайней мере две разные мРНК с различной последовательностью 5'-конца, отредактированные разными гРНК. Возможно, белковые продукты таких матриц обладают различной способностью встраиваться в митохондриальную мембрану.

В качестве заключения надо отметить, что в молекулярной биологии есть несколько «любимых» объектов, которые активно изучают тысячи разных лабораторий по всему миру. Это, конечно, прежде всего, человек, мышь, мухи рода *Drosophila* и круглый червь *Caenorhabditis elegans*. Всему остальному разнообразию животного мира посвящено крайне мало работ. Столь однобокий подход в выборе объекта исследования часто оказывается не слишком продуктивным и сильно сужает наши представления о разнообразии процессов, которые могут протекать в клетке. Приведенный выше пример является хорошим тому подтверждением. Явление, обнаруженное на трипаносомах и поначалу представлявшееся странным исключением, оказалось широко распространенным и важным в жизни многих организмов, включая человека. Вероятно, еще много серьезных открытий будет сделано при изучении редких объектов, в частности простейших.