

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ: БЕЗ CRISPR/CAS9 НЕ ОБОЙТИСЬ?

И. В. Чичерин¹, С. А. Левицкий¹, И. А. Крашенинников¹, И. Тарасов², П. А. Каменский^{1,3} ✉

¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

²Лаборатория молекулярной генетики, геномики и микробиологии, Страсбургский университет, Страсбург, Франция

³Институт живых систем, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград

Мутации в митохондриальном геноме являются причиной серьезных наследственных заболеваний человека. На сегодняшний день существует несколько способов их коррекции, которые, однако, вряд ли могут быть повсеместно внедрены в клиническую практику. С другой стороны, в последние годы крайне активно развивается технология редактирования геномов CRISPR/Cas9. В работе приводится обзор существующих способов борьбы с митохондриальными мутациями, показываются основные их недостатки. Также анализируются возможности создания версии технологии CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций в митохондриальной ДНК, обсуждаются основные этапы, которые необходимо пройти для этого. Особое внимание уделяется техническим сложностям, которые могут возникать при создании такой технологии. В целом принципиальных препятствий к разработке системы mitoCRISPR/Cas9 не выявлено.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, митохондриальные болезни, генная терапия, редактирование геномов, CRISPR/Cas9

Финансирование: Российский научный фонд, грант № 14-50-00029 (МГУ имени М. В. Ломоносова); Программа 5–100 Министерства образования и науки РФ (БФУ им. И. Канта); Международная ассоциированная лаборатория RNA-mitocure (МГУ им. М. В. Ломоносова и Страсбургский университет).

✉ **Для корреспонденции:** Каменский Петр Андреевич
Ленинские горы, д. 1, стр.12, г. Москва, 119991 (биологический факультет); peter@protein.bio.msu.ru

Статья получена: 20.06.2017 **Статья принята к печати:** 23.06.2017

THE PROSPECTS OF GENE THERAPY FOR MITOCHONDRIAL DISEASES: CAN'T WE DO WITHOUT CRISPR/CAS9?

Chicherin I¹, Levitsky SA¹, Krasheninnikov IA¹, Tarassov I², Kamenski P^{1,3} ✉

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Laboratory of Molecular Genetics, Genomics and Microbiology, University of Strasbourg, Strasbourg, France

³Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Mitochondrial DNA mutations cause severe inherited disorders in humans. To date, there are a few therapeutic strategies for their correction; however, it is highly unlikely that they would be routinely used in clinical practice. The past few years have witnessed the rapid progress of a genome editing technology known as CRISPR/Cas9. The present review focuses on the current strategies to combat mitochondrial mutations and reveals their major drawbacks. The article also explores the possibility of creating a possible specific CRISPR/Cas9 tool for correcting mitochondrial DNA mutations and provides a rough description of its mechanism of action. A particular focus is paid to technical challenges. On the whole, we see no principal barriers to implementing a mitoCRISPR/Cas9 system for treating mitochondrial disorders.

Keywords: mitochondrial DNA, mitochondrial diseases, gene therapy, genome editing, CRISPR/Cas9

Funding: Russian Science Foundation, grant No. 14-50-00029 (Lomonosov Moscow State University); *Project 5–100* of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Immanuel Kant Baltic Federal University); the International Associated Laboratory *RNA-mitocure* (Lomonosov Moscow State University and the University of Strasbourg).

✉ **Correspondence should be addressed:** Peter Kamenski
Leninskie Gory, d. 1, str. 12, Moscow, Russia, 119991 (Faculty of Biology); peter@protein.bio.msu.ru

Received: 20.06.2017 **Accepted:** 23.06.2017

Митохондриальный геном человека представляет собой двуцепочечную молекулу ДНК размером около 16,5 тыс. пар нуклеотидов, кодирующую 13 белков, 22 тРНК и 2 рРНК [1]. Мутации в митохондриальной ДНК встречаются в общечеловеческой популяции с частотой около 1 : 3500 [2]. Следует отметить, что далеко не всегда такие мутации,

даже если они расположены в кодирующих участках митохондриальной ДНК, приводят к развитию заболевания. В первую очередь это связано с феноменом гетероплазмии — одновременным присутствием в клетке мутантных и немутантных молекул ДНК [3]. Фенотипическое проявление мутации всегда зависит от уровня гетероплазмии, то

есть от соотношения количеств нормальных и мутантных молекул митохондриального генома. Если заболевание, вызванное мутацией в митохондриальной ДНК, все же проявляется, то чаще всего оно относится к нейромышечным болезням: именно в нервной и мышечной тканях, требующих большого количества АТФ, функция митохондрий наиболее важна для клеток.

На сегодняшний день митохондриальные болезни неизлечимы. Пациенты получают лишь симптоматическое лечение, которое обычно незначительно улучшает качество их жизни. В течение почти двух десятилетий разрабатываются различные генно-терапевтические подходы к супрессии мутаций в митохондриальном геноме [4]. Не останавливаясь на них подробно, перечислим их основные типы:

- аллотопическая экспрессия (экспрессия гена митохондриального белка в цитоплазме с последующим импортом такого белка в митохондрии и его включением в митохондриальные процессы вместо мутантного),

- ксенотопическая экспрессия (экспрессия в цитоплазме гена, ортологичного митохондриальному, из другого организма, с последующим импортом такого белка в митохондрии и его включением в митохондриальные процессы вместо мутантного),

- трансфекция синтезированных *in vitro* митохондриальных тРНК или мРНК в клетку с их последующим импортом в митохондрии и включением в митохондриальную трансляцию вместо мутантных,

- импорт в митохондрии «векторных» нуклеиновых кислот, несущих последовательности, комплементарные участку мутации митохондриальной ДНК, связывающихся с этими участками и ингибирующих репликацию мутантных молекул,

- использование специальных везикул, специфически проникающих через митохондриальные мембраны, для доставки биологических макромолекул в митохондрии с последующим их включением в молекулярные процессы в органеллах вместо мутантных.

Все эти подходы показали свою эффективность в экспериментах на культурах клеток человека. Их общим недостатком является то, что они не элиминируют саму мутацию в митохондриальном геноме, а лишь снижают уровень гетероплазмы, что, в свою очередь, приводит к частичному или полному восстановлению митохондриальной функции. Даже если представить, что подобные подходы когда-нибудь будут внедрены в клиническую практику, то очевидно, что они не воспрепятствуют передаче мутации по наследству следующим поколениям. Использование технологий, приводящих к исправлению мутаций в митохондриальных геномах, было бы более перспективным.

Митохондриально-заместительная терапия

Пожалуй, самым эффективным способом борьбы с мутациями в митохондриальном геноме является так называемая митохондриально-заместительная терапия (MRT, от англ. Mitochondrial Replacement Therapy) [5]. Этот способ не может использоваться для лечения взрослого человека, однако дает возможность матери — носителю мутации — родить здорового ребенка без мутаций в митохондриальной ДНК. При проведении MRT производится перенос диплоидного ядра из оплодотворенной яйцеклетки в донорскую яйцеклетку, предоставленную здоровой женщиной. Из донорской яйцеклетки предварительно удаляет-

ся ядро, но сохраняются все митохондрии. Таким образом, получившаяся яйцеклетка содержит ядро с генетическим материалом родителей и митохондрии с немутантной ДНК от «второй матери». После этого яйцеклетка вносится в организм матери, и начинается нормальное внутриутробное развитие. Эта технология в настоящее время уже разрешена для применения в клиниках экстракорпорального оплодотворения в Великобритании. Ожидается, что первый «ребенок от трех родителей» появится на свет до конца 2017 г., хотя некоторые страны, в которых подобные вопросы законодательно не регулируются, уже сообщили об успешном использовании MRT на практике и о рождении здоровых детей. Митохондриально-заместительная терапия является крайне удобным и технически несложным методом, однако ее применение вызывает массу этических вопросов [6, 7]. Более того, в 2016 г. Управление по контролю продуктов и лекарственных средств США (FDA) начало процесс рассмотрения данной технологии с целью одобрения ее внедрения в практику, однако вскоре получило законодательный запрет на такое рассмотрение [8] (именно по этическим соображениям). Таким образом, повсеместное распространение MRT в настоящее время вызывает серьезные сомнения.

«Митохондриальные цинковые пальцы» и mitoTALEN

Также было создано несколько систем коррекции мутаций в митохондриальной ДНК на основе молекулярных технологий редактирования генома. Такие системы ассоциированы с гораздо меньшим количеством этических проблем, чем технологии MRT. Была показана возможность сиквенс-специфического внесения двуцепочечных разрывов в мутантные молекулы митохондриальной ДНК при помощи эндонуклеаз рестрикции [9], эндонуклеаз типа «цинковые пальцы» [10] и системы TALEN [11]. Во всех этих случаях внесение разрывов сопровождалось значительным снижением уровня гетероплазмы митохондриальной ДНК, что указывает на деградацию линейризованных молекул. Более того, в случае использования системы mitoTALEN удалось достичь практически количественной селективной элиминации мутантной митохондриальной ДНК.

Эти подходы потенциально могли бы решить проблему митохондриальных болезней человека. Тем не менее они также не лишены недостатков. При использовании эндонуклеаз рестрикции требуется, чтобы мутация в митохондриальной ДНК приводила к формированию уникального сайта рестрикции, а такому условию из всех известных на сегодня патогенных мутаций удовлетворяет лишь одна. Эндонуклеазы типа «цинковые пальцы» и система TALEN более универсальны, поскольку позволяют осуществлять избирательное связывание и расщепление любых участков ДНК при помощи конструирования специфических белковых последовательностей. Однако именно это и является их основным недостатком: для каждой мутации требуется отдельно проводить дизайн и биосинтез ДНК-связывающих белковых компонентов данных систем. Также нужно отметить, что даже если в случае некоторых конкретных мутаций подобные подходы оказались эффективными, это еще не значит, что их удастся с той же эффективностью использовать для остальных мутаций, поскольку хорошо известно, что успешная работа как «цинковых пальцев», так и TALEN в значительной степени зависит от целевой последовательности ДНК. Помимо этого,

показано, что использование обеих технологий сопровождается неспецифическими эффектами в отношении митохондриальной ДНК, что приводит к значительному уменьшению количества ее немутантных копий в клетке [10]. Наконец, использование как «цинковых пальцев», так и TALEN требует экспериментальной оптимизации компонентов систем — подбора оптимальных белковых последовательностей, что является достаточно трудоемкой, длительной и дорогостоящей процедурой.

Технология CRISPR/Cas9

Итак, можно утверждать, что на сегодняшний день отсутствуют способы коррекции мутаций в митохондриальной ДНК, которые были бы одновременно эффективными, технически несложными, дешевыми и не вызывали бы этических проблем. Однако всем этим критериям удовлетворяет система CRISPR/Cas9.

По механизму своей работы она напоминает систему TALEN и состоит из гидовых РНК CRISPR, связывающихся с целевыми участками ДНК по принципу комплементарности, и эндонуклеазы Cas9, осуществляющей двуцепочечный разрыв цепочки ДНК в месте связывания гидовых РНК. Данная система в живой природе существует у бактерий и используется ими для защиты от бактериофагов. В 2013 г. была впервые показана возможность использования технологии CRISPR/Cas9 для избирательного разрезания ДНК человека в живой клетке [12]. Это стало толчком для взрывообразного развития генно-терапевтических приложений технологии. Так, в 2015 г. при помощи технологии CRISPR/Cas9 была проведена коррекция мутаций в эмбрионах человека [13]. Также оказалось, что CRISPR/Cas9 может быть невероятно эффективной и в сельском хозяйстве: с помощью этой технологии уже получено множество новых сортов растений, некоторые из которых одобрены для сельскохозяйственного использования в отдельных странах [14]. В области редактирования геномов животных также достигнуты определенные успехи (например, были созданы породы коров, устойчивых к туберкулезу [15], но к настоящему времени соответствующие продукты еще не выведены на рынки.

Широчайшее распространение технологии CRISPR/Cas9 объясняется в основном тем, что в качестве компонентов системы, обеспечивающих ее целевое воздействие на геном, используются короткие РНК. Это делает применение технологии CRISPR/Cas9 гораздо более простым и дешевым по сравнению с технологиями «цинковых пальцев» и TALEN, в случае которых требуется каждый раз проводить дизайн и синтез больших белковых молекул. «Слабым местом» системы CRISPR/Cas9 является так называемый эффект off-target: зачастую разрезание геномной ДНК происходит не только в целевом участке, но и в нескольких других, близких по последовательности к целевому. Это практически никогда не приводит к дополнительному изменению фенотипа, однако недостаточно высокая специфичность технологии в любом случае является серьезной проблемой, на решение которой направлены усилия множества научных групп по всему миру.

В настоящее время несколько лабораторий занимаются разработкой версии системы CRISPR/Cas9 для редактирования митохондриальной ДНК. Такая система могла бы стать оптимальным способом борьбы с патогенными мутациями в митохондриальном геноме. Во-первых, редактирование эмбрионов человека посредством такой

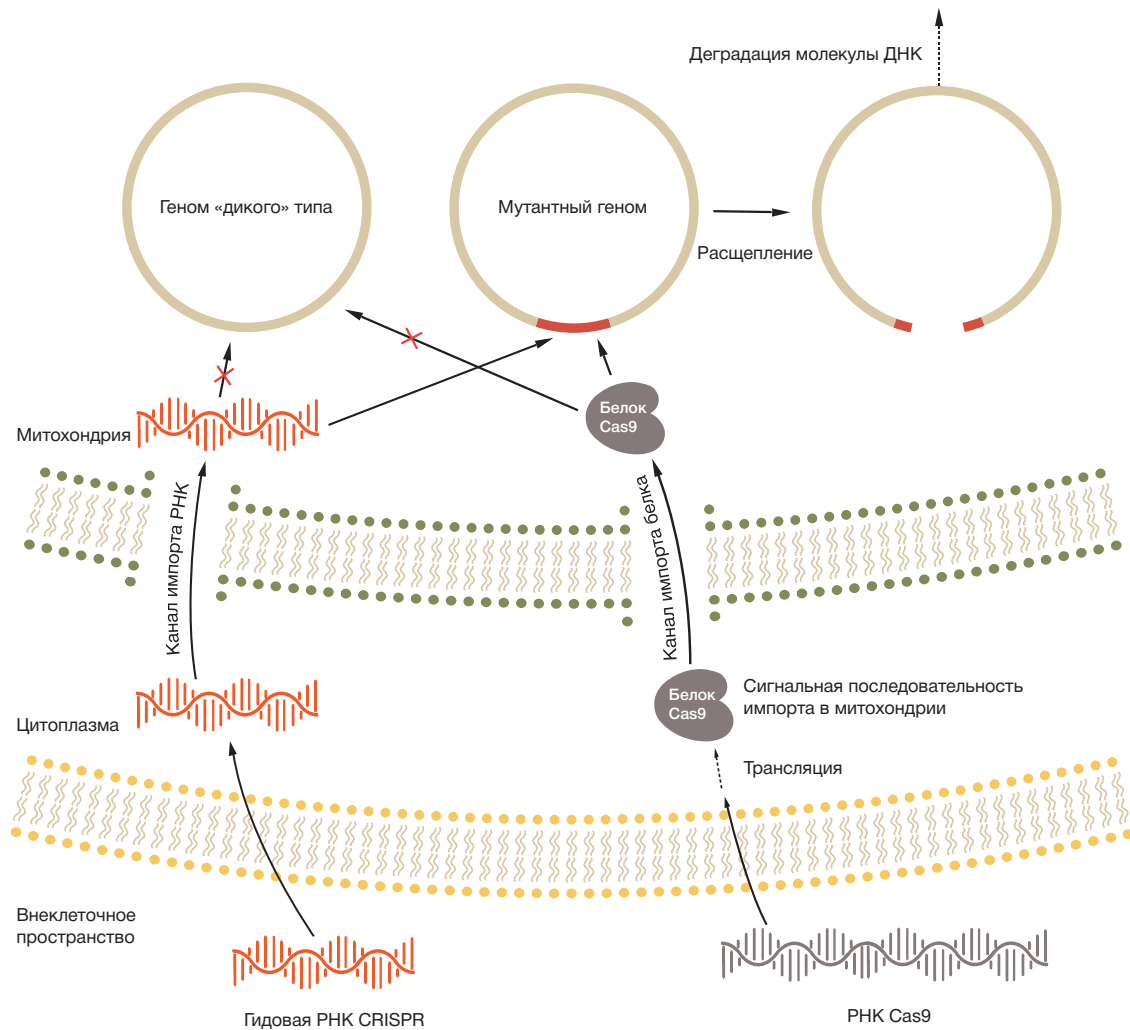
системы может решить проблему передачи митохондриальных мутаций по наследству. Во-вторых, с использованием систем адресной доставки в различные органы и ткани такая система может серьезно улучшить качество жизни взрослых людей, страдающих от митохондриальных заболеваний. Наконец, в-третьих, как уже отмечалось выше, такая система вызывает существенно меньше этических вопросов, чем технология MRT. Однако на сегодняшний день общепризнанной технологии mitoCRISPR/Cas9 не существует. Нужно отметить, что одна работа с описанием подобной системы все-таки имеется, однако достоверность ее результатов подвергается серьезному сомнению научным сообществом.

Как создать систему mitoCRISPR/Cas9?

Рассмотрим основные этапы, которые, по нашему мнению, необходимо пройти для создания митохондриальной версии системы CRISPR/Cas9 (рисунок). Мы не претендуем на абсолютную полноту и правильность данного списка, но отмечаем, что подобного систематического анализа в научной литературе до сегодняшнего дня не имелось.

1. *Направление нуклеазы Cas9 в митохондрии.* В любой эукариотической клетке, в том числе и в клетке человека, функционирует прекрасно изученный аппарат импорта белков в митохондрии [16]. Большинство импортируемых белков содержит на N-концах специальные сигнальные последовательности длиной несколько десятков аминокислот, наличие которых обычно является необходимым и достаточным условием импорта. Добавление на N-конец неимпортируемого цитоплазматического белка такой сигнальной последовательности приводит к тому, что такой гибридный белок начинает импортироваться в митохондрии и обычно проявляет функциональную активность в органеллах; при этом сигнальная последовательность отщепляется митохондриальными протеазами. Никаких препятствий к осуществлению аналогичной процедуры с белком Cas9 нет. Более того, в научной литературе уже имеется описание версии Cas9, импортирующейся в митохондрии клеток человека [17]. Нужно отметить, что в случае митохондрий вполне может быть использован способ доставки Cas9, считающийся в настоящее время оптимальным, а именно: доставка мРНК Cas9 в клетку с ее последующей трансляцией цитоплазматическими рибосомами. Если доставляемая мРНК будет кодировать митохондриальную сигнальную последовательность, то синтезируемый белок будет направляться из цитоплазмы в митохондрии.

2. *Импорт гидовых РНК CRISPR в митохондрии и их связывание с мутантными молекулами митохондриальной ДНК.* Импорт РНК в митохондрии — процесс, также известный в живой природе [18]. Описаны нуклеотидные последовательности и структурные мотивы молекул РНК, опять-таки являющиеся необходимым и достаточным условием их импорта в митохондрии клеток человека [19, 20]. Помимо этого, показано, что химерные РНК, состоящие из данных структурных мотивов и других последовательностей, эффективно импортируются в митохондрии и даже связываются с митохондриальной ДНК по принципу комплементарности [21]. Более того, такое связывание может происходить селективным образом только с мутантной ДНК, причем импортируемые РНК способны дискриминировать даже точечные мутации в митохондриальном геноме, практически не связываясь при этом



Возможный механизм работы системы mitoCRISPR/Cas9

с нормальными молекулами ДНК органелл [22]. Таким образом, существует экспериментально показанная возможность транспорта РНК CRISPR (в составе химерных молекул РНК) в митохондрии и их избирательного связывания с участками мутаций в митохондриальном геноме.

3. *Предотвращение попадания компонентов системы CRISPR/Cas9 в ядро.* Гидовые РНК CRISPR, предназначенные для работы в митохондриях, теоретически могут оказаться в ядре после трансфекции клеток и даже связаться там с какими-либо участками генома. Однако это не должно приводить к негативным последствиям, поскольку митохондриальная версия Cas9 в ядре оказаться не может: она не содержит в своем составе сигнальной последовательности на импорт в ядро, без чего транспорт белков в ядро невозможен. Впрочем, контроль присутствия этих макромолекул в ядре при разработке митохондриальной версии системы CRISPR/Cas9 обязательно должен проводиться.

4. *Разрезание мутантных молекул ДНК в митохондриях.* На первый взгляд, данный этап не должен вызывать сколько-нибудь серьезных проблем. Если все компоненты системы окажутся в органеллах, разрезание должно произойти с очень высокой вероятностью, подобно тому, как это происходит при работе системы CRISPR/Cas9 в ядре. Более того, такое разрезание уже показано в случае технологии mitoTALEN (см. выше). Однако не стоит забывать,

что митохондриальная ДНК существует в виде достаточно плотно упакованного ДНК-белкового комплекса, называемого нуклеоидом [23], причем плотность его упаковки, по некоторым данным, превышает таковую в случае ядерной ДНК. Соответственно, можно предположить, что это может помешать разрезанию ДНК нуклеазой Cas9. Впрочем, это все же маловероятно, поскольку (1) система mitoTALEN не испытывает серьезных затруднений в аналогичной ситуации и (2) плотная упаковка митохондриальной ДНК не препятствует связыванию с ней малых РНК (см. выше), а значит, не должна препятствовать и работе нуклеазы.

5. *Преодоление эффекта off-target.* Напомним, что данный эффект в основном вызывается связыванием гидовых РНК CRISPR с нецелевыми участками генома, схожими по последовательности с целевым участком. Вряд ли это возможно в случае митохондриального генома человека, который имеет всего 16,5 тыс. пар нуклеотидов в длину. При использовании гидовых РНК стандартного размера (около 20 нуклеотидов) нецелевое связывание должно происходить с гораздо меньшей частотой, чем при манипуляциях с ядерным геномом, и даже если часть немутантных молекул митохондриальной ДНК окажется разрезанными и будут элиминированы, это не должно существенно сказаться на функции клетки. Впрочем, эффект off-target должен тщательно контролироваться при разработке системы mitoCRISPR/Cas9.

6. Элиминация линеаризованных мутантных молекул митохондриальной ДНК. На данном финальном этапе работы гипотетической системы mitoCRISPR/Cas9, казалось бы, также не должно возникать серьезных затруднений, тем более что подобная элиминация была продемонстрирована при работе системы mitoTALEN (см. выше). Более того, при направленном внесении в митохондриальную ДНК двуцепочечных разрывов факта их репарации обнаружено не было; вместо этого происходила именно элиминация линеаризованной ДНК [24]. Теоретически в случае образования в молекуле митохондриальной ДНК двуцепочечного разрыва может также происходить рекомбинация с участием неразрезанных молекул. Однако прямого доказательства существования процессов рекомбинации в митохондриях клеток человека до сих пор не имеется. Тем не менее не стоит забывать о такой возможности. После воздействия нуклеазы Cas9 гидовые РНК CRISPR должны некоторое время оставаться связанными с участками ДНК

в непосредственной близости от разрыва. Это может приводить к временной стабилизации линеаризованной ДНК и, как следствие, к увеличению вероятности рекомбинационной репарации разрыва. Теоретически возможно, что для эффективной работы системы mitoCRISPR/Cas9 необходимо будет временно ингибировать системы рекомбинации и репарации в органеллах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на текущий уровень знаний о молекулярной биологии митохондрий и уровень развития технологии CRISPR/Cas9, можно заключить, что непреодолимых препятствий на пути к созданию митохондриальной версии этой технологии нет. Мы надеемся, что система mitoCRISPR/Cas9 будет создана в недалеком будущем и по праву займет лидирующее место в ряду современных подходов к супрессии мутаций в митохондриальной ДНК.

Литература

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9; 290 (5806): 457–65.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders — past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6; 1659 (2–3): 115–20.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May; 6 (5): 389–402.
- Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO. Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc)*. 2014 Nov; 79 (11): 1151–60. DOI: 10.1134/S0006297914110029.
- Wolf DP, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med*. 2015 Feb; 21 (2): 68–76. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.12.001.
- Rulli T. The Mitochondrial Replacement 'Therapy' Myth. *Bioethics*. 2017 Jun; 31 (5): 368–74. DOI: 10.1111/bioe.12332.
- Burrell C. Mitochondrial replacement therapy and 'three-parent children' — who should be registered as the legal parents? *BJOG*. 2017 Jun; 124 (7): 1056. DOI: 10.1111/1471-0528.14638.
- Adashi EY, Cohen IG. Mitochondrial Replacement Therapy: Unmade in the USA. *JAMA*. 2017 Feb 14; 317 (6): 574–5. DOI: 10.1001/jama.2016.20935.
- Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease Smal into mitochondria. *J Biomed Sci*. 2002; 9 (6 Pt 1): 534–41.
- Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19; 44 (16): 7804–16. DOI: 10.1093/nar/gkw676.
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*. 2013 Sep; 19 (9): 1111–3. DOI: 10.1038/nm.3261.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Apr; 32: 76–84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol*. 2017 Feb 1; 18 (1): 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.
- Straub SP, Stiller SB, Wiedemann N, Pfanner N. Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery. *Biol Chem*. 2016 Nov 1; 397 (11): 1097–114. DOI: 10.1515/hsz-2016-0145.
- Orishchenko KE, Sofronova JK, Chupakhin EG, Lunev EA, Mazunin IO. Delivery Cas9 into mitochondria. *Genes and Cells*. 2016; 11: 100–5.
- Sieber F, Duchene AM, Marechal-Drouard L. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 287: 145–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00004-9.
- Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 27; 109 (13): 4840–5. DOI: 10.1073/pnas.1116792109.
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP et al. Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*. 2010 May; 16 (5): 926–41. DOI: 10.1261/rna.1914110.
- Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Aure K 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 Jan 7; 41 (1): 418–33. DOI: 10.1093/nar/gks965.
- Tonin Y, Heckel AM, Vysokikh M, Dovvydenko I, Meschaninova M, Rotig A et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem*. 2014 May 9; 289 (19): 13323–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.528968.
- Kolesnikov AA. The Mitochondrial Genome. *The Nucleoid, Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81 (2): 1057–65.
- Moretton A, Morel F, Macao B, Lachaux P, Ishak L, Lefebvre M et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. *PLoS One*. 2017 Apr 28; 12 (4): e0176795. DOI: 10.1371/journal.pone.0176795.

References

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9; 290 (5806): 457–65.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders — past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6; 1659 (2–3): 115–20.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May; 6 (5): 389–402.
- Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO. Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc)*. 2014 Nov; 79 (11): 1151–60. DOI: 10.1134/S00062979141110029.
- Wolf DP, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med*. 2015 Feb; 21 (2): 68–76. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.12.001.
- Rulli T. The Mitochondrial Replacement 'Therapy' Myth. *Bioethics*. 2017 Jun; 31 (5): 368–74. DOI: 10.1111/bioe.12332.
- Burrell C. Mitochondrial replacement therapy and 'three-parent children' — who should be registered as the legal parents? *BJOG*. 2017 Jun; 124 (7): 1056. DOI: 10.1111/1471-0528.14638.
- Adashi EY, Cohen IG. Mitochondrial Replacement Therapy: Unmade in the USA. *JAMA*. 2017 Feb 14; 317 (6): 574–5. DOI: 10.1001/jama.2016.20935.
- Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease Smal into mitochondria. *J Biomed Sci*. 2002; 9 (6 Pt 1): 534–41.
- Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J, et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19; 44 (16): 7804–16. DOI: 10.1093/nar/gkw676.
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*. 2013 Sep; 19 (9): 1111–3. DOI: 10.1038/nm.3261.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Apr; 32: 76–84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol*. 2017 Feb 1; 18 (1): 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.
- Straub SP, Stiller SB, Wiedemann N, Pfanner N. Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery. *Biol Chem*. 2016 Nov 1; 397 (11): 1097–114. DOI: 10.1515/hsz-2016-0145.
- Orishchenko KE, Sofronova JK, Chupakhin EG, Lunev EA, Mazunin IO. Delivery Cas9 into mitochondria. *Genes and Cells*. 2016; 11: 100–5.
- Sieber F, Duchene AM, Marechal-Drouard L. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 287: 145–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00004-9.
- Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 27; 109 (13): 4840–5. DOI: 10.1073/pnas.1116792109.
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP et al. Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*. 2010 May; 16 (5): 926–41. DOI: 10.1261/rna.1914110.
- Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Aure K, 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 Jan 7; 41 (1): 418–33. DOI: 10.1093/nar/gks965.
- Tonin Y, Heckel AM, Vysokikh M, Dovydenko I, Meschaninova M, Rotig A, et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem*. 2014 May 9; 289 (19): 13323–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.528968.
- Kolesnikov AA. The Mitochondrial Genome. *The Nucleoid, Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81 (2): 1057–65.
- Moretton A, Morel F, Macao B, Lachaume P, Ishak L, Lefebvre M et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. *PLoS One*. 2017 Apr 28; 12 (4): e0176795. DOI: 10.1371/journal.pone.0176795.