

Некоторые аспекты репарации и редактирования РНК

М. В. Ковальчук

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

m.v.kovalchuk@imbg.org.ua

Молекулы РНК в клетках повреждаются так же, как и молекулы ДНК, а иногда и намного масштабнее. В настоящем обзоре рассмотрены агенты, повреждающие РНК, и некоторые аспекты репарации и редактирования РНК, а также их отличие от механизмов репарации ДНК.

Ключевые слова: РНК, репарация, коррекция, AlkB.

Введение. Макромолекулы живых клеток, такие как ДНК, РНК и белки, постоянно подвергаются воздействию многих эндо- и экзогенных факторов, что приводит к их повреждению. Последствия нарушений в молекулах ДНК из-за их большого размера, низкой копийности и выполнения функций носителей генетической информации для живых организмов носят драматический характер. Поэтому в процессе эволюции клетки выработали ряд механизмов, защищающих и восстанавливающих эти макромолекулы. В клетках человека под действием собственных метаболитов и факторов окружающей среды, например УФ-излучения, может произойти около 1 млн повреждений ДНК на клетку в сутки. Эндогенные источники способны генерировать примерно 20000 нарушений ДНК на клетку в день [1]. И с основной массой таких повреждений справляются репаративные системы клетки. Способность клетки репарировать изменения ДНК является жизненно важной для сохранения целостности

генома и поддержания стабильности генетического материала в ряду поколений.

Репарация – это свойственный клеткам всех организмов механизм исправления повреждений в макромолекулах (ДНК, РНК), возникающих под действием факторов окружающей среды (например, ионизирующих излучений), а также нормальных метаболических процессов, происходящих в клетке. Репарация осуществляется специальными ферментами клетки. Структурная организация молекул ДНК и развитые репаративные системы призваны защищать ДНК, чего нельзя сказать о других важных макромолекулах, например РНК. Исходя из структуры и компартиментализации молекул РНК они должны разрушаться значительно чаще, чем ДНК. Об этом свидетельствуют экспериментальные данные. В частности, при заболевании Альцгеймера до 50 % мРНК в затронутых зонах мозга содержат окисленные нуклеозиды [2].

Хотя считается, что РНК, в отличие от ДНК, находятся в клетке в избытке, все молекулы РНК причастны к синтезу белка и регуляторным механиз-

мам клетки. Только 28 % ДНК генома человека транскрибируется в РНК и лишь 5 % этих транскрибируемых последовательностей действительно кодируют белки [3, 4]. Следовательно, клеточная физиология может больше пострадать от повреждения именно РНК. Информация о повреждениях РНК, несмотря на их глобальную возможность влиять на физиологию клетки, а также о механизмах, помогающих клеткам справляться с такими повреждениями, недостаточно представлена в литературе. Кроме того, существует неоднозначность самого представления о процессе репарации РНК. Ведь в отличие от ДНК молекулы РНК в процессе созревания приобретают способность функционировать в трансляционном комплексе или участвовать в регуляторных процессах. Такие изменения опосредуются комплексами белков, например, сплайсосомами. Иногда очень близкие по строению и функционированию ферменты участвуют как в созревании, так и в репарации молекул РНК, что вносит еще больше противоречий в существующие представления о репарации РНК.

Агенты, повреждающие РНК, и механизмы их устранения. Структурное подобие оснований, образующих ДНК (А, Т, Г, Ц) и РНК (А, У, Г, Ц), предполагает, что и разрушаться они могут сходным образом (спонтанно, химически, энзиматически). К основным факторам повреждения РНК относятся спонтанная депуринизация, деаминирование оснований, повреждения активными формами кислорода, УФ-излучение, алкилирование, эндогенные метаболиты, ошибки транскрипции, стрессы биотической природы, сопровождающиеся ферментативным расщеплением молекул и т. д. [5, 6].

Примером спонтанного изменения является деаминирование цитозина до урацила. Эта мутация немедленно узнается и корректируется в ДНК, которая, в отличие от РНК, не содержит урацила. В эксперименте *in vitro* продемонстрировано, что деаминирование цитозина до урацила происходит в 100 раз чаще в одноцепочечных ДНК, чем в двухцепочечных [7]. Деаминирование цитозина, содержащегося в пролиновых кодонах мРНК, преобразует их в лейциновые. Кодоны, кодирующие аланин, могут превращаться в валиновые. Следовательно,

спонтанное изменение нуклеотидов РНК способно нарушать точность считывания генетической информации.

Повреждения РНК активными формами кислорода занимают одно из первых мест и активно изучаются. Доминирующий у современных организмов обмен веществ, основанный на восстановлении молекулярного кислорода, сопровождается продуцированием при нормальном метаболизме клетки разновидностей реактивного кислорода, а именно – супероксида, пероксида водорода, гидроксильных радикалов, атомарного кислорода и их количество увеличивается при ультрафиолетовом, ионизирующем облучениях и действии разных химических веществ [8, 9].

Детектируется более 20 видов нуклеотидов, измененных окислением [10]. Среди многочисленных продуктов нуклеотидного окисления 8-гидроксидезоксигуанозин и 8-гидроксигуанозин хорошо изучены и являются маркерами кислородного повреждения ДНК и РНК. 8-окси-7, 8-дигидрогуанин (8ОГ) наиболее распространен и, похоже, играет критическую роль при мутациях и карциногенезе. 8ОГ способен взаимодействовать как с аденином, так и цитозином во время репликации, что иногда приводит к трансверсиям. В РНК 8ОГ также может присутствовать как результат либо включения окисленного предшественника, либо экспозиции РНК с реактивным кислородом. Окисление гуанина в РНК, как правило, происходит более активно по сравнению с ДНК, поскольку РНК состоит из одной цепи и ее основания не защищены водородными связями. Такое предположение в ряде работ подтверждено экспериментально [11, 12].

Окисление мРНК приводит к потере нормального уровня содержания и функции белка, продуцированию дефектных белков, их агрегации, что является признаками нейродегенеративных заболеваний [13, 14]. В опытах *in vitro* в трансляционных системах показан ингибирующий эффект поврежденной мРНК на уровне элонгации, т. е. повреждение может блокировать продвижение рибосомы: одного нарушения бывает достаточно для блокирования трансляции [15]. Мутации в рибосомных субъединицах способны увеличивать частоту возникновения трансляционных ошибок [16].

Таким образом, все дефекты в РНК вызывают изменение их функций. Исследования показали, что повреждения РНК могут приводить к задержке клеточного цикла и гибели клетки так же, как и повреждения ДНК [17].

Получение высокоспецифических антител к окисленным формам гуанина позволило проанализировать распределение и плотность повреждений НК *in situ*. А поскольку обработка именно РНКазами, а не ДНКазами ослабляла ответ иммунной реакции, то окисленные нуклеотиды, в основном, оказались ассоциированными с РНК. Например, показано, что у больных с синдромом Альцгеймера и Паркинсона цитоплазматические РНК и митохондриальные ДНК являются главными мишенями окислительного повреждения [18]. Такая закономерность подтверждена и микроскопическими исследованиями, выявившими, что окисленные нуклеотиды локализованы в рибосомных структурах. Шен и Лин [13] обнаружили, что при болезни Альцгеймера значительное количество поли(А)⁺мРНК в мозге окислено. Установлено, что 30–70 % мРНК из фронтальной части коры пораженного головного мозга являются окисленными, тогда как в постмортальных образцах мозга нормальных контролей окислены лишь 2 % мРНК [13].

Чтобы избежать последствий кислородного повреждения РНК, клетки должны вырабатывать защитные механизмы. У всех организмов идентифицировано большое количество белков, удаляющих 8ОГ из ДНК или не допускающих его внедрения в ДНК [19]. Из всех этих белков только один препятствует попаданию окисленного гуанина в РНК. Белок MutT *Escherichia coli* может гидролизировать 8-охо-dGTP так же интенсивно, как и 8-охо-GTP, являясь, таким образом, барьером для окисленных предшественников в РНК во время транскрипции [20]. Однако МТН1, ортолог MutT у млекопитающих, обладает намного меньшей способностью к гидролизу 8-охо-GTP.

Несмотря на большое количество исследований, связанных с ферментами, препятствующими аккумуляции 8ОГ в ДНК, не описано ни одного белка, причастного к восстановлению окисленной РНК. Поэтому единственным способом избежать пагубного действия на клетку окисленной РНК яв-

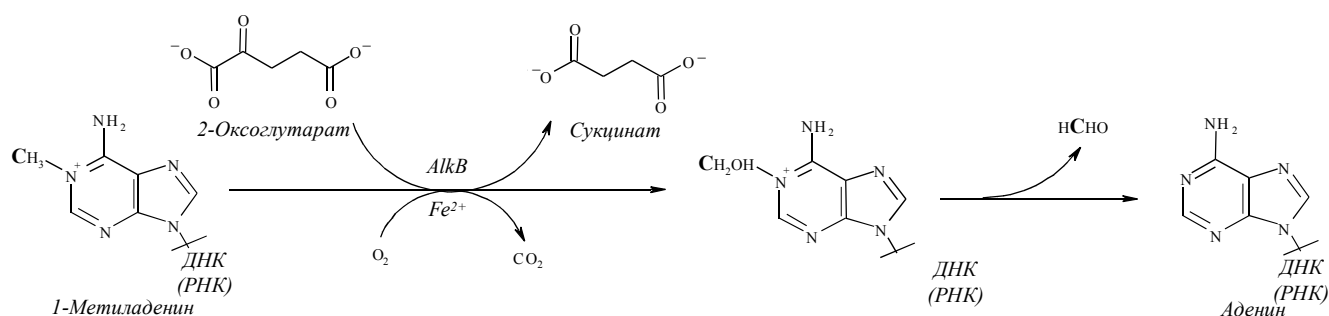
ляется элиминация поврежденных РНК за счет отделения их от нормальных молекул. Бактерии *E. coli* содержат ферменты, специфически связывающиеся с 8ОГ-содержащими РНК [21]. Один из таких белков (полинуклеотидфосфорилаза, Pnp) взаимодействует с окисленными РНК и является компонентом РНК-деградосомы [22]. Подобно Pnp у *E. coli* в клетках человека найден белок УВ-1 с подобными свойствами [23]. Пока не описаны другие белки, специфически связывающиеся с 8ОГ-содержащими РНК [24].

В настоящее время не выявлены механизмы защиты РНК в клетках от повреждения активными формами кислорода, которые можно назвать собственно репарацией, а все известные ферменты, репарирующие окисленную ДНК, требуют наличия комплементарной цепи.

Алкилирующие повреждения РНК и их репарация. Хотя повреждения такого типа находятся не на первом месте, механизм их действия наиболее изучен, поскольку алкилирующие агенты интенсивно используются в химиотерапии онкозаболеваний. Они взаимодействуют с азотом и кислородом оснований НК, поставляя метильные и этильные группы и образуя О- и N-алкилированные нуклеотиды, а также являются как мутагенами, так и генотоксинами, повреждают молекулы РНК и вносят свой вклад в цитотоксичность.

Репарация алкильных повреждений ДНК гликозилазами и трансферазами в необратимой реакции достаточно изучена [25]. Третий механизм репарации алкильных повреждений открыт недавно. И, главное, показано, что он может восстанавливать алкилированные РНК и не зависит от матрицы [26, 27]. Его открытие можно связать с геном *alkB* *E. coli*, идентифицированным более 20 лет тому назад [28]. Выявлено, что мутанты *alkB* обладают повышенной чувствительностью к метилирующему агенту метилметансульфонату.

Эксперименты, основанные на преимущественном выживании алкилированного фага λ в клетках дикого типа по сравнению с *alkB*-мутантными клетками, продемонстрировали, что ген *alkB* вовлечен в репарацию ДНК. Дальнейшие исследования показали, что ген *alkB* расположен рядом с геном *ada* на хромосоме *E. coli* и что они составляют один



Окислительное деметилирование 1-meA ферментом AlkB [27]

оперон [29]. Позже установлено, что повышенная устойчивость к алкилированию является свойством, присущим самому продукту AlkB, так как экспрессия *AlkB E. coli* в клеточных линиях человека дает такой же алкил-резистентный фенотип, как и у *E. coli* [30]. Вскоре был идентифицирован первый гомолог AlkB у человека [31]. Подробное картирование генома человека позволило выявить восемь гомологов AlkB (*hABH*). Оказалось, что мРНК для одного из *hABH1* присутствует во всех тестируемых тканях человека, свидетельствуя о важности этого гена для большинства тканей. Продемонстрировано, что мутанты *alkB E. coli*, в основном, дефектны по устранению метилирующих повреждений в одноцепочечных ДНК [32] и что самыми подходящими субстратами для AlkB являются 1-meA и 3-meC. Тем не менее, механизм действия AlkB оставался непонятным до появления работы [33], авторы которой с использованием биоинформатических подходов показали, что этот белок принадлежит к большому классу ферментов, известных как семейство Fe(II)- и 2-оксиглутаратзависимых оксигеназ [33].

При анализе геномной последовательности, основываясь на сходстве с другими ферментами, авторы предсказали, что AlkB может вызывать окисление метильной группы поврежденных оснований ДНК и РНК и таким образом удалять алкильные группы из оснований. Еще через год две группы ученых смогли экспериментально подтвердить предсказанную ферментативную активность [34, 35]. Показано, что AlkB способен репарировать 1-meA и 3-meC в одно- и двухцепочечных ДНК с по-

мощью молекулярного кислорода, 2-оксиглутарата и Fe(II) для окисления метильной группы. В итоге восстанавливается нуклеотид и освобождается формальдегид (рисунок).

В 2007 году обнаружено, что ген человека *FTO*, определяющий предрасположенность к ожирению, кодирует функциональный гомолог фермента AlkB [36, 37], интенсивно экспрессирующийся в гипоталамусе мозга. Его дефекты обусловлены возрастанием жировых отложений в теле. Предпочтение белком FTO в качестве субстрата метилированной одноцепочечной РНК позволяет рассматривать его как РНК-деметилазу. Предполагается, что FTO катализирует реакцию деметилирования предварительно не узнаваемого метилирования РНК и приводит в действие генную регуляторную функцию на уровне РНК [36, 38]. Обсуждается связь этой функции с фенотипом ожирения.

Гомологи AlkB обнаружены во всех многоклеточных организмах, но их распространение этим не ограничивается. Домен AlkB присутствует в сложном полибелке ряда растительных вирусов, большинство из которых принадлежит к семейству *Flexiviridae* [39]. Вирусные AlkB выявили высокую степень сходства с гомологами бактерий и человека. Все эти ферменты содержат несколько консервативных аминокислотных остатков в области, соответствующей нуклеотидному узнаванию AlkB *E. coli*. Обнаружено, что два остатка (Trp69 и Tyr76) находятся в тесном контакте с субстратом 1-meA у AlkB *E. coli* в 3D-структуре [40].

Показана роль вирусных AlkB в поддержании целостности вирусного РНК-генома за счет удале-

ния алкилирующих повреждений [41]. AlkB-содержащие вирусы поражают, в основном, лесные породы деревьев и многолетние растения и на протяжении многих лет выживают в сосудах флоэмы, что обеспечивает им трансмиссию в новые растения. Авторы предположили, что вирусный геном в таких условиях подвергается значительному метилированию, а вирусные AlkB способствуют размножению вируса, репарируя повреждения РНК. Не исключено, что к вирусам ген *alkB* попал вследствие горизонтального генного переноса от фитопатогенов или симбионтов растений.

Поскольку алкилирующие повреждения содержат угрозу передаче и целостности генетической информации, хранимой в ДНК и РНК, все организмы выработали репарирующие системы для их устранения. Впервые после многих дискуссий о возможности репарации РНК был открыт механизм, восстанавливающий алкилированные нуклеотиды в РНК (в начале 2000-х гг.), и охарактеризованы соответствующие ферменты. Эти работы способствовали дальнейшему поиску новых ферментов, участвующих в репарации РНК, а также пересмотру функций уже изученных.

Сплайсинг тРНК и его репарация у бактерий. Расщепления в фосфодиэфирном скелете геномной ДНК или молекул РНК может приводить к гибели клеток, если они не репарируются. Такая деградация, очевидно, запускается физическими или химическими агентами, ферментным гидролизом и цитотоксическими препаратами.

Запрограммированным называют расщепление молекул РНК, происходящее при сплайсинге интронсодержащих тРНК, нетрадиционном мРНК-сплайсинге при *unfolded protein response*, а также при антивирусном ответе клетки-хозяина. Иницирует это событие сайт-специфическое расщепление молекулы РНК эндонуклеазой.

Во многих случаях сайт-специфическое расщепление определенных РНК генерирует 2',3'-циклический фосфат и 5'-ОН на окончаниях расщепленной молекулы. Для функционирования молекулы повреждение должно быть репарировано, а места разрыва молекулы – ремодулированы до того, как молекула сошьется лигазой. Ремодулирование окончаний фрагментов включает гидролиз 2',

3'-циклического фосфата и фосфорилирование 5'-ОН до формы 5'-PO₄.

Следующий этап, связанный с исправлением запрограммированных расщеплений, в литературе часто называют репарирующей фазой. Тем не менее, восстановление молекулы РНК при созревании и собственно репарация при вирусной инфекции отличаются. Фермент полинуклеотидкиназа (Pnk), открытый в 1965 году у бактериофагов T4 и T2, хорошо известен и является незаменимым инструментом в молекулярной биологии. В то же время меньше принимается во внимание тот факт, что Pnk T4 осуществляет определенный путь репарации РНК *in vivo*. Во время инфекционного процесса, вызванного фагом T4 у *E. coli*, Pnk участвует в развитии взаимодействия патоген–хозяин, где бактерии блокируют синтез белка фага, индуцируя сайт-специфические поломки клеточных тРНК, в частности, антикодоновой петли тРНК^{Lys} нуклеазой *PrrC E. coli*, на которые фаг отвечает репарацией расщепленных тРНК с помощью Pnk и T4-РНК-лигазы Rnl1 [42].

В настоящее время механизм действия и структура Pnk T4 детально изучены. Очевидно, что Pnk T4 представляет собой образец расширяющегося семейства репарирующих ферментов, ремодулирующих места расщепления в молекулах ДНК и РНК [43].

Интересно сравнить данные литературы, где представлены два пути восстановления молекул РНК при тРНК-сплайсинге у дрожжей и репарации при вирусной инфекции, отличающиеся этапом ремоделирования 3'-конца расщепленной молекулы, что приводит к разным конечным продуктам в процессе лигирования [43, 44].

Восстановление концов и сшивание в РНК-репарирующем механизме фагов осуществляются двумя ферментами – бифункциональным Pnkr и Rnl1, в то время как в клетках дрожжей при сплайсинге тРНК эти шаги выполняет один фермент Trl1 (дрожжевая тРНК-лигаза). Trl1 – многофункциональный фермент, состоящий из двух отдельных доменов: ремодулирующего концы РНК в точке разрыва и лигирующего. В свою очередь, ремодулирующий домен включает модуль Trl1 (389–827), гидролизующий 2', 3'-циклический фосфат про-

ксимального фрагмента тРНК до 3'-ОН, 2'-РО₄ и модуль Pnk, фосфорилирующий 5'-ОН-группу дистального фрагмента тРНК. Лигирующий домен фермента Trl1 (1–388) соединяет концы с образованием 2'-РО₄ и 3'-5'-фосфодиэфирной связи в месте поломки [45].

Существуют и другие отличия при тРНК-сплайсинге у дрожжей и репарации тРНК фагами. Интрон обычно локализован в антикодовой петле предшественника тРНК и должен быть точно удален, чтобы тРНК функционировала в синтезе белка. Вследствие двух разрезов на границе экзон–интрон, выполняемых тРНК-сплайсинговой эндонуклеазой, узнающей трехмерную структуру предшественника, образуются 2', 3'-циклический фосфат и 5'-ОН-группы в двух сайтах расщепления. Структура и механизм действия этой эндонуклеазы консервативны у всех эукариотов и архей [46].

Американские исследователи описали уникальную РНК-репарирующую систему у бактерий [47]. Новизна ее состоит в том, что перед восстановлением поврежденной РНК в месте разрыва к 2'-ОН-группе присоединяется метильная группа, делая невозможным расщепление молекулы в этом сайте повторно. Таким образом, репарированная РНК становится «лучше, чем новая». В этом процессе участвует стабильный гетеротетрамер, образованный двумя бактериальными белками (Pnkr и Hen1), который восстанавливает расщепленную риботоксины тРНК. Неожиданным оказалось то, что эукариотный гомолог Hen1 является одним из трех ферментов (наряду с Dicer и Argonaute), важных для образования малых некодирующих РНК (из 19–30 нуклеотидов) в РНК-интерференции эукариотов. Бактериальный белок Hen1 оказался частью РНК-репарирующей системы [47, 48].

Ошибки при транскрипции и их коррекция. Поскольку в процессе биосинтеза молекул РНК возникает много ошибок, в ходе эволюции появились механизмы их устранения. К ним можно отнести коррекцию нуклеиновых кислот при транскрипции (proofreading). Она включает исправление ошибок РНК-полимеразами по механизмам, аналогичным таковым, наблюдаемым для ДНК-полимераз, и является консервативной для прокариотов, эукариотов и архей.

РНК, как и ДНК, могут повреждаться или неправильно копироваться. Как клетка определяет, что мРНК повреждена или неправильно скопирована и что она делает с неверно синтезированными копиями, является объектом интенсивного исследования под общим названием «контроль качества». У про- и эукариотов существуют механизмы элиминации некорректных транскриптов за счет качественного контроля [49, 50].

Известно, что средний размер молекул белков у прокариотов составляет 300–400 аминокислотных остатков (а. о.) [51]. Это эквивалентно транскриптам длиной 1 тыс. п. н. Геном *E. coli* K-12 [52] содержит самую длинную рамку считывания для кодирования белка, состоящего из 2383 а. о. Соответствующий транскрипт должен включать более 7200 нуклеотидов. С учетом точности транскрипции современных РНК-полимераз (10^{-4}) они могут допускать одну ошибку на каждые 10 транскриптов у бактерий, а для самой длинной рамки считывания *E. coli* ошибки могут быть в двух из трех транскриптов.

Геном человека кодирует белок титин, состоящий из 26926 а. о. и являющийся самым длинным из известных белков [53]. Около 80 тыс. п. н. требуется для кодирующего участка (без интронов), что предполагает около восьми ошибок на мРНК в процессе транскрипции. Даже с учетом избыточности кода ряд мРНК имеют кодирующие ошибки и единственные известные пути надзора обусловлены транскриптами с преждевременными терминальными сигналами (nonsense-mediated decay) [49] или транскриптами, утратившими стоп-кодон (nonstop decay) [50]. Без какой-либо коррекции количество мРНК с кодирующими ошибками должно быть значительным. Следовательно, РНК также является объектом коррекции [54, 55]. Потеря транскрипционной точности в процессе синтеза мРНК приводит к продуцированию мутантных белков, нарушающему функционирование клетки.

Во время синтеза ДНК ДНК-полимераза проявляет 3'→5'-нуклеазную активность для исправления новосинтезированной ДНК [56]. По аналогии с ДНК-полимеразой показано, что 3'→5'-экзонуклеазная активность присуща РНК-полимеразам, вовлеченным в транскрипционную коррекцию [54,

57–59]. Как прокариотные, так и эукариотные РНК-полимеразы обладают 3'→5'-нуклеазной активностью. У *E. coli* транскрипционные факторы элонгации GteA и GteB индуцируют нуклеазную активность, что повышает точность транскрипции *in vitro* [57].

По-видимому, в момент приостановления действия РНК-полимеразы в процессе элонгации факторы, стимулирующие нуклеазную активность, связываются с полимеразой, заставляя ее возвращаться и гидролизовать образовавшийся транскрипт. В результате 3'-конец транскрипта диссоциирует от каталитического центра фермента [60]. Затем элонгация продолжается снова. Способность преодолевать блокирования в процессе элонгации (включающие мис-инкорпорации) интерпретируется как повышение точности процесса и поэтому важна для качественного контроля транскриптов.

В процессе неправильного встраивания нуклеотида в растущую цепь РНК присоединение следующего нуклеотида замедляется в 5–20 раз по сравнению с правильной инкорпорацией. Это дает время для стимулирующего расщепление РНК фактора, например, транскрипционного фактора TFIIIS, чтобы связать заблокированную РНК-полимеразу II (pol II) и, как следствие, удалить неправильно подобраный нуклеотид, используя 3' → 5'-нуклеазную активность pol II [61]. Исследование РНК-полимеразы II человека предоставило очевидное доказательство pol II-проверочного считывания и коррекции ошибок, хотя и другим РНК-полимеразам присуща 3' → 5'-нуклеазная активность.

Известно, что транскрипционная коррекция и репарация РНК отличаются от механизмов РНК-надзора (nonsense-mediated mRNA decay; nonsense-mediated transcriptional gene silencing; nonstop mRNA decay; no-go mRNA decay). Это свидетельствует о том, что качественный контроль синтеза РНК не ограничивается деградацией молекул [62].

Редактирование митохондриальной тРНК. Наиболее изученным случаем редактирования РНК органелл является репарация тРНК в митохондриях млекопитающих [55]. В отличие от описанного выше механизма проверочного считывания, присутствующего у прокариотов, эукариотов и архей, репарация тРНК в настоящий момент ограничена ми-

тохондриями млекопитающих. В митохондриальном геноме большого количества многоклеточных гены тРНК расположены встык, иногда они даже перекрываются и имеют от одного до шести общих нуклеотидов [63, 64]. В дальнейшем из длинных транскриптов нуклеазами вырезаются отдельные молекулы тРНК. При этом одна тРНК освобождается в виде целой молекулы, несущей перекрывающийся участок на 5'-конце, другая – находится в 3'-усеченной форме, вследствие чего происходит дотраивание 3'-конца тРНК.

В ходе развития митохондриального генома наследственный механизм репарации тРНК мог быть вовлечен в эволюцию перекрывающихся генов [65]. Следовательно, восстановление усеченных продуктов, очевидно, представляет лишь один аспект репарации тРНК. Далее тРНК с неправильной 3'-последовательностью деградирует под действием нуклеаз и снова наращивается; когда синтезируется необходимая последовательность, тРНК может аминокислотироваться и выходить из цикла деградации [55]. Этот тип репарации, возможно, обусловлен специфической особенностью митохондриального генома и отличается от механизма редактирования РНК, впервые обнаруженного у трипаносом, а затем выявленного в соматических клетках млекопитающих.

Заключение. До конца 20-го века вопрос о репарации РНК в литературе не освещался. Относительно хорошо были изучены проблемы стабилизации РНК [66]. По сравнению с ДНК молекулы РНК живут меньше. К тому же продолжительность их существования регулируется в клетках организма. Время полураспада мРНК у высших эукариотов может отличаться в 1000 раз в диапазоне от минут до суток [67, 68].

Для некоторых видов клеток, особенно безъядерных эритроцитов млекопитающих, подвергшихся необратимому и глобальному транскрипционному аресту на последней стадии дифференциации и длительно циркулирующих в кровеносной системе без ядра, время функционирования мРНК имеет критическое значение. Неудивительно, что самыми долгоживущими оказались глобиновые мРНК, кодируемые α- и β-глобиновыми генными кластерами. Время их полураспада в эритроцитах

человека составляет 24–60 ч. Казалось бы, в природе должны быть предусмотрены механизмы репарации для мРНК, на которых синтезируется около 300 млн молекул гемоглобина в каждой клетке. В настоящее время не обнаружено механизмов репарации РНК в эритроцитах млекопитающих.

По-видимому, два фактора – длительный период транскрипции глобиновых генов (содержание мРНК, кодируемых α - и β -глобиновыми генами, увеличивается от 1 до 95 % от общего количества мРНК в дифференцированных эритроцитах) [69] и структурная стабильность детерминант в 3'-нетранслируемых участках глобиновых мРНК (синтез глобиновых белков продолжается в ретикулоцитах еще в течение 2–3 дней после потери ядра) [70, 71] – дают возможность эритроциту синтезировать достаточное количество гемоглобина без привлечения механизмов, связанных с репарацией РНК.

Лишь после 2000 года появился ряд веских аргументов в пользу существования репарации РНК. Экспериментальное выявление ферментов, восстанавливающих метилированные РНК, подтвердило новую точку зрения. Одновременно возникли разногласия в том, какие процессы считать репарацией РНК [72]. В дискуссиях получил право на существование термин «*bona fide* repair RNA». Оказалось, что, перефразируя пословицу, репарация РНК лежит на самой поверхности, а искали ее где-то очень глубоко.

Хотя за последние 10 лет публикаций, касающихся репарации РНК, стало больше, определения собственно репарации РНК так и не появилось. В основном считается, что процессы репарации РНК аналогичны таковым у ДНК. Возможно, это является одной из причин разногласий в том, какие процессы считать репарацией РНК.

Поскольку в клетке молекулы ДНК и РНК выполняют разные функции, то и репарация их также должна иметь качественные отличия. ДНК является лишь хранилищем информации, тогда как молекулы РНК – это «рабочие копии гена». В клетке всего несколько копий молекул ДНК, поэтому репарационные механизмы призваны восстановить ошибки в нуклеотидной последовательности и непрерывность молекул ДНК, являющихся элемен-

том структурно-функционального образования – хромосомы.

Информационный поток возникает на молекулах ДНК и заканчивается образованием продуктов, таких как белки, жиры, углеводы и, наконец, новые клетки. В реальном времени и реальном пространстве, т. е. в живой клетке, реализация генетической информация начинается с молекул РНК, которые с момента синтеза до начала своего функционирования как реализатора информационной программы адаптируются к условиям клетки. Цена такой адаптации – увеличивающаяся возможность ошибок. Во время созревания молекул РНК происходит ряд их превращений, сопровождающихся изменением размеров транскриптов, рамок считывания, модификацией отдельных нуклеотидов, достраиванием новых. В случае молекул ДНК такие изменения приводили бы к повреждению структуры и, значит, к потере основной функции – хранилища информации. В РНК подобные нарушения адаптируют первичный транскрипт к функционированию в конкретной клетке. Если для ДНК репарировать молекулу – означает восстановить ее исходную структуру, то для РНК – восстановить ее функцию или преобразовать молекулу до такого состояния, при котором она будет функционировать в трансляционном комплексе или участвовать в регуляторных процессах. При этом структура молекулы может кардинально отличаться от исходной.

Сейчас очевидно, что молекулы РНК являются не только посредниками в переносе генетической информации от ДНК к белкам, но и ключевыми игроками во многих механизмах, контролирующих экспрессию генетической информации.

Для РНК эу- и прокариотов характерны многочисленные изменения в нуклеотидном составе, связанные, вероятно, с регуляторными функциями РНК. Из 100 выявленных в природе модификаций нуклеотидов в РНК эукариотов примерно 20 представлены метилированием нуклеотидов в определенных позициях, что сопровождается появлением, в частности, 1-метиладенаина и 3-метилцитозина [73]. Такие энзиматические модификации РНК связывают с контролем генной экспрессии как при транскрипции, так и при трансляции [74]. Они важны для взаимодействий РНК–РНК и РНК–белок, а

также для структурной стабильности и корректного фолдинга РНК. Масштабные изменения, возникающие при декодировании генетической информации транспортными РНК, также сопряжены с модификациями оснований в тРНК [75]. В этой связи, в отличие от ДНК, возникает вопрос: «Какие модифицированные основания должны репарироваться в РНК и как в такой ситуации функционируют, например, AlkB-ферменты и их гомологи?», а открытая в 2009 году еще одна форма репарации РНК у прокариотов четко подтверждает неоднозначность процесса репарации РНК в природе, т. е. что считать «репарацией РНК *bona fide*?» еще предстоит выяснить.

M. V. Kovalchuk

Some aspects of RNA repair and editing

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

All cellular RNA molecules are damaged at the scale of DNA molecules, or even more. In the present review the RNA damaging agents, some mechanisms of RNA repair and editing, their difference from DNA repair mechanisms have been discussed.

Keywords: RNA, repair, proofreading, AlkB.

M. V. Ковальчук

Деякі аспекти репарації і редагування РНК

Резюме

Молекули РНК у клітинах пошкоджуються так само, як і молекули ДНК, а інколи й набагато масштабніше. У представленому огляді розглянуто агенти, які пошкоджують РНК, та деякі аспекти репарації і редагування РНК, а також їхні відмінності від механізмів репарації ДНК.

Ключові слова: РНК, репарація, корекція, AlkB.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*.—1993.—**362**, N 6422.—P. 709–715.
2. Shan X., Chang Y., Lin C. L. Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression // *FASEB J.*—2007.—**21**, N 11.—P. 2753–2764.
3. Baltimore D. Our genome unveiled // *Nature*.—2001.—**409**, N 6822.—P. 814–816.
4. Castellani R. J., Nunomura A., Rolston R. K., Moreira P. I., Takeda A., Perry G., Smith M. A. Sublethal RNA oxidation as a mechanism for neurodegenerative disease // *Int. J. Mol. Sci.*—2008.—**9**, N 5.—P. 789–806.
5. Hoeijmakers J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // *Nature*.—2001.—**411**, N 6835.—P. 366–374.
6. Wurtmann E. J., Wolin S. L. RNA under attack: cellular handling of RNA damage // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*—2009.—**44**, N 1.—P. 34–49.
7. Frederico L. A., Kunkel T. A., Shaw B. R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy // *Biochemistry*.—1990.—**29**, N 10.—P. 2532–2537.
8. Thompson D. M., Lu C., Green P. J., Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes // *RNA*.—2008.—**14**, N 10.—P. 2095–2103.
9. Kong Q., Shan X., Chang Y., Tashiro H., Glenn Lin C. RNA oxidation: a contributing factor or an epiphenomenon in the process of neurodegeneration // *Free Radic. Res.*—2008.—**42**, N 9.—P. 773–777.
10. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // *Annu. Rev. Biochem.*—1994.—**63**.—P. 915–948.
11. Wamer W. G., Wei R. R. *In vitro* photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation // *Photochem. Photobiol.*—1997.—**65**, N 3.—P. 560–563.
12. Hofer T., Badouard C., Bajak E., Ravanat J. L., Mattsson C., Cotgreave I. A. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA // *Biol. Chem.*—2005.—**386**, N 4.—P. 333–337.
13. Shan X., Lin C. L. Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging*.—2006.—**27**, N 5.—P. 657–662.
14. Nunomura A., Hofer T., Moreira P. I., Castellani R. J., Smith M. A., Perry G. RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders // *Acta Neuropathol.*—2009.—**118**, N 1.—P. 151–166.
15. Ougland R., Zhang C. M., Liiv A., Johansen R. F., Seeberg E., Hou Y. M., Remme J., Falnes P. O. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation // *Mol. Cell*.—2004.—**16**, N 1.—P. 107–116.
16. O'Connor M., Dahlberg A. E. Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.—1993.—**90**, N 19.—P. 9214–9218.
17. Bellacosa A., Moss E. G. RNA repair: damage control // *Curr. Biol.*—2003.—**13**, N 12.—P. 482–484.
18. Nunomura A., Perry G., Pappolla M. A., Wade R., Hirai K., Chiba S., Smith M. A. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease // *J. Neurosci.*—1999.—**19**, N 6.—P. 1959–1964.
19. Slupphaug G., Kavli B., Krokan H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage // *Mutat. Res.*—2003.—**531**, N 1–2.—P. 231–251.
20. Taddei F., Hayakawa H., Bouton M., Cirinesi A., Matic I., Sekiguchi M., Radman M. Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage // *Science*.—1997.—**278**, N 5335.—P. 128–130.
21. Hayakawa H., Kuwano M., Sekiguchi M. Specific binding of 8-oxoguanine-containing RNA to polynucleotide phosphorylase protein // *Biochemistry*.—2001.—**40**, N 33.—P. 9977–9982.
22. Carpousis A. J. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E // *Annu. Rev. Microbiol.*—2007.—**61**.—P. 71–87.
23. Hayakawa H., Uchiyama T., Fukuda T., Ashizuka M., Kohno K., Kuwano M., Sekiguchi M. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine // *Biochemistry*.—2002.—**41**, N 42.—P. 12739–12744.

24. *Brregeon D., Sarasin A.* Hypothetical role of RNA damage avoidance in preventing human disease // *Mutat. Res.*—2005.—**577**, N 1–2.—P. 293–302.
25. *Sedgwick B., Lindahl T.* Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage // *Oncogene.*—2002.—**21**, N 58.—P. 8886–8894.
26. *Falnes P. O., Bjoras M., Aas P. A., Sundheim O., Seeberg E.* Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins // *Nucl. Acids Res.*—2004.—**32**, N 11.—P. 3456–3461.
27. *Falnes P. O., Klungland A., Alseth I.* Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation // *Neuroscience.*—2007.—**145**, N 4.—P. 1222–1232.
28. *Kataoka H., Yamamoto Y., Sekiguchi M.* A new gene (*alkB*) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate // *J. Bacteriol.*—1983.—**153**, N 3.—P. 1301–1307.
29. *Kondo H., Nakabeppu Y., Kataoka H., Kuhara S., Kawabata S., Sekiguchi M.* Structure and expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA // *J. Biol. Chem.*—1986.—**261**, N 33.—P. 15772–15777.
30. *Chen B. J., Carroll P., L. Samson L.* The *Escherichia coli* AlkB protein protects human cells against alkylation-induced toxicity // *J. Bacteriol.*—1994.—**176**, N 20.—P. 6255–6261.
31. *Wei Y. F., Carter K. C., Wang R. P., Shell B. K.* Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an *Escherichia coli* AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair // *Nucl. Acids Res.*—1996.—**24**, N 5.—P. 931–937.
32. *Dinglay S., Trewick S. C., Lindahl T., Sedgwick B.* Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants // *Genes Dev.*—2000.—**14**, N 16.—P. 2097–2105.
33. *Aravind L., Koonin E. V.* The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases // *Genome Biol.*—2001.—**2**, N 3.—R0007.1–R0007.8.
34. *Falnes P. O., Johansen R. F., Seeberg E.* AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli* // *Nature.*—2002.—**419**, N 6903.—P. 178–182.
35. *Trewick S. C., Henshaw T. F., Hausinger R. P., Lindahl T., Sedgwick B.* Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage // *Nature.*—2002.—**419**, N 6903.—P. 174–178.
36. *Gerken T., Girard C. A., Tung Y. L., Webby C. J., Saudek V., Hewitson K. S., Yeo G. S., McDonough M. A., Cunliffe S., McNeill L. A., Galvanovskis J., Rorsman P., Robins P., Prietur X., Coll A. P., Ma M., Jovanovic Z., Farooqi I. S., Sedgwick B., Barroso I., Lindahl T., Ponting C. P., Ashcroft F. M., O'Rahilly S., Schofield C. J.* The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase // *Science.*—2007.—**318**, N 5855.—P. 1469–1472.
37. *Sanchez-Pulido L., Andrade-Navarro M. A.* The *FTO* (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily // *BMC Biochem.*—2007.—**8**—P. 23–28.
38. *Jia G., Yang C.-G., Yang S., Jian X., Yi C., Zhou Z., He C.* Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human *FTO* // *FEBS Lett.*—2008.—**582**, N 23–24.—P. 3313–3319.
39. *Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F., Dolja V. V.* Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity // *Annu. Rev. Phytopathol.*—2007.—**45**—P. 73–100.
40. *Yu B., Edstrom W. C., Benach J., Hamuro Y., Weber P. C., Gibney B. R., Hunt J. F.* Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB // *Nature.*—2006.—**439**, N 7078.—P. 879–884.
41. *van den Born E., Omelchenko M. V., Bekkelund A., Leihne V., Koonin E. V., Dolja V. V., Falnes P. O.* Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation // *Nucl. Acids Res.*—2008.—**36**, N 17.—P. 5451–5461.
42. *Amitsur M., Levitz R., Kaufman G.* Bacteriophage T4 anticodon nuclease, polynucleotide kinase, and RNA ligase reprocess the host lysine tRNA // *EMBO J.*—1987.—**6**, N 8.—P. 2499–2503.
43. *Wang L. K., Lima C. D., Shuman S.* Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme // *EMBO J.*—2002.—**21**, N 14.—P. 3873–3880.
44. *Schwer B., Aronova A., Ramirez A., Braun P., Shuman S.* Mammalian 2',3' cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNP) can function as a tRNA splicing enzyme *in vivo* // *RNA.*—2008.—**14**, N 2.—P. 204–210.
45. *Keppetipola N., Nandakumar J., Shuman S.* Reprogramming the tRNA-splicing activity of a bacterial RNA repair enzyme // *Nucl. Acids Res.*—2007.—**35**, N 11.—P. 3624–3630.
46. *Xue S., Calvin K., Li H.* RNA recognition and cleavage by a splicing endonuclease // *Science.*—2006.—**312**, N 5775.—P. 906–910.
47. *Chan C. M., Zhou C., Huang R. H.* Reconstituting bacterial RNA repair and modification *in vitro* // *Science.*—2009.—**326**, N 5950.—P. 247.
48. *Jain R., Shuman S.* Bacterial Hen1 is a 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase component of a bacterial RNA repair cassette // *RNA.*—2010.—**16**, N 2.—P. 316–323.
49. *Wilusz C. J., Wang W., Peltz S. W.* Curbing the nonsense: the activation and regulation of mRNA surveillance // *Genes Dev.*—2001.—**15**, N 21.—P. 2781–2785.
50. *Vasudevan S., Peltz S. W., Wilusz C. J.* Non-stop decay – a new mRNA surveillance pathway // *Bioessays.*—2002.—**24**, N 9.—P. 785–788.
51. *Skovgaard M., Jensen L. J., Brunak S., Ussery D., Krogh A.* On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes // *Trends Genet.*—2001.—**17**, N 8.—P. 425–428.
52. *Blattner F. R., Plunkett G. 3rd, Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // *Science.*—1997.—**277**, N 5331.—P. 1453–1462.
53. *Labeit S., Kolmerer B.* Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity // *Science.*—1995.—**270**, N 5234.—P. 293–296.
54. *Thomas M. J., Platas A. A., Hawley D. K.* Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II // *Cell.*—1998.—**93**, N 4.—P. 627–637.
55. *Reichert A. S., Morl M.* Repair of tRNAs in metazoan mitochondria // *Nucl. Acids Res.*—2000.—**28**, N 10.—P. 2043–2048.
56. *Joyce C. M., Steitz T. A.* Function and structure relationships in DNA polymerases // *Annu. Rev. Biochem.*—1994.—**63**—P. 777–822.
57. *Erie D. A., Hajiseyedjavadi O., Young M. C., von Hippel P. H.* Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription // *Science.*—1993.—**262**, N 5135.—P. 867–873.
58. *Lange U., Hausner W.* Transcriptional fidelity and proofreading in Archaea and implications for the mechanism of TFS-induced RNA cleavage // *Mol. Microbiol.*—2004.—**52**, N 4.—P. 1133–1143.
59. *Koyama H., Ito T., Nakanishi T., Sekimizu K.* Stimulation of RNA polymerase II transcript cleavage activity contributes to

- maintain transcriptional fidelity in yeast // *Genes Cells.*—2007.—**12**, N 5.—P. 547–559.
60. *Fish R. N., Kane C. M.* Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors // *Biochim. Biophys. Acta.*—2002.—**1577**, N 2.—P. 287–307.
61. *Wind M., Reines D.* Transcription elongation factor SII // *Bioessays.*—2000.—**22**, N 4.—P. 327–336.
62. *Isken O., Maquat L. E.* Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function // *Genes Dev.*—2007.—**21**, N 15.—P. 1833–1856.
63. *Tomita K., Ueda T., Watanabe K.* RNA editing in the acceptor stem of squid mitochondrial tRNA(Tyr) // *Nucl. Acids Res.*—1996.—**24**, N 24.—P. 4987–4991.
64. *Lavrov D. V., Brown W. M., Boore J. L.* A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 25.—P. 13738–13742.
65. *Gray M. W., Burger G., Lang B. F.* Mitochondrial evolution // *Science.*—1999.—**283**, N 5407.—P. 1476–1481.
66. *Ross J.* mRNA stability in mammalian cells // *Microbiol. Rev.*—1995.—**59**, N 3.—P. 423–450.
67. *Jacobson A., Peltz S. W.* Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells // *Annu. Rev. Biochem.*—1996.—**65**.—P. 693–739.
68. *Friedel C. C., Dolken L., Ruzsics Z., Koszinowski U. H., Zimmer R.* Conserved principles of mammalian transcriptional regulation revealed by RNA half-life // *Nucl. Acids Res.*—2009.—**37**, N 17.—e115.
69. *Morales J., Russell J. E., Liebhaber S. A.* Destabilization of human α -globin mRNA by translation anti-termination is controlled during erythroid differentiation and is paralleled by phased shortening of the Poly(A) tail // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**, N 10.—P. 6607–6613.
70. *Weiss I. M., Liebhaber S. A.* Erythroid cell-specific mRNA stability elements in the α 2-globin 3' nontranslated region // *Mol. Cell. Biol.*—1995.—**15**, N 5.—P. 2457–2465.
71. *Waggoner S. A., Liebhaber S. A.* Regulation of α -globin mRNA stability // *Exp. Biol. Med.*—2003.—**228**, N 4.—P. 387–395.
72. *Poole A. M., Logan D. T.* Modern mRNA proofreading and repair: clues that the last universal common ancestor possessed an RNA genome? // *Mol. Biol. Evol.*—2005.—**22**, N 6.—P. 1444–1455.
73. *Saikia M., Dai Q., Decatur W. A., Fournier M. J., Piccirilli J. A., Pan T.* A systematic, ligation-based approach to study RNA modifications // *RNA.*—2006.—**12**, N 11.—P. 2025–2033.
74. *Namy O., Rousset J. P., Naphine S., Brierley I.* Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression // *Mol. Cell.*—2004.—**13**, N 2.—P. 157–168.
75. *Argis P. F.* Decoding the genome: a modified view // *Nucl. Acids Res.*—2004.—**32**, N 1.—P. 223–238.

UDC 577.21:577.113.4
Received 27.07.10