

Краткое описание проекта

ПНИ «Разработка генетических конструкций для коррекции митохондриальных дисфункций»

Этап №2 (01.01.2015 – 30.06.2015)

по теме: Предварительная разработка генетической конструкции для супрессии мутаций в митохондриальном геноме

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 07.08.2014г. № 14.604.21.0113 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 3 в период с 01 июля 2015 года по 31 декабря 2015 года в соответствии с «Планом - графиком исполнения обязательств» по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

1. Проведены теоретические и экспериментальные исследования механизмов импорта генетической конструкции в митохондрии. Достоверно установлено, что для проникновения внутрь митохондрий белок-нуклеинового комплекса, необходим полноразмерный ДНК-связывающий белок Abf2p. Показано, что клетки человека содержат систему импорта нуклеиновых кислот в митохондрии, организованную аналогично хорошо изученной дрожжевой системе. Это наблюдение будет использовано для достижения целей ПНИ на следующих этапах работ.
2. Проведены теоретические и экспериментальные исследования механизмов супрессии мутаций в митохондриальном геноме, вызываемой импортом генетической конструкции. Экспериментально были исследованы возможные механизмы супрессии мутаций в митохондриальном геноме, вызываемой генетической конструкцией, и показано, что таким механизмом может быть гомологичная рекомбинация.
3. Исследованы теоретические возможности использования генетической конструкции для супрессии как минимум одной из семи основных патогенных мутаций (m.3460A>G, m.11778G>A, m.14484T>C, m.8993T>G, m.3243A>G, m.8344A>G, «основная делеция» (8483-13459)) в митохондриальном геноме человека, имеющих клинические проявления (синдромы MERRF, MELAS или KSS). Обоснован выбор одной из семи мутаций, а именно - «основная делеция». Выявлена возможность использовать генетическую конструкцию для супрессии митохондриальных мутаций.
4. Установлены теоретические и экспериментальные возможности использования генетической конструкции в лабораторной практике при работах на культуре клеток человека и/или модельных организмах. Показано преимущество пивных дрожжей *S.cerevisiae* в создании моделей, приближенных к клетке человека.
5. Проведен детальный анализ научно-технической литературы, нормативнотехнической документации и других материалов, относящихся к разрабатываемой теме - всего 158 источников.

При этом **были получены следующие результаты:**

Продолжая теоретические и экспериментальные исследования механизмов импорта генетических конструкций в митохондрии и возможности супрессии мутаций с помощью этих конструкций, было установлено, что белково-нуклеиновый вектор достоверно

проникает в изолированные митохондрии дрожжей. Высказанное ранее предположение, что ДНК-связывающий дрожжевой белок Abf2p подходит для построения вектора подтвердилось. В свою очередь, эксперименты, направленные на снижение размеров белковой части вектора за счет создания рекомбинантных белков, аналогичных доменам НМG1 и НМG2, однозначно показали, что в функциональном смысле домены не заменяют полноразмерный белок. Векторы, полученные на основе доменов и синтетических олигонуклеотидов, обладали пониженной стабильностью.

В результате этапа №2 ПНИ была доказана невозможность замены белка Abf2p любым из двух его доменов НМG1 или НМG2 для дальнейших генно-инженерных манипуляций по доставке конструкции в митохондрии. В свою очередь, в ходе лабораторных исследований, было показано, что фрагмент ДНК, аналогичный выпадающему фрагменту мтДНК при «основной делеции», встроенный в плазмиду, может проникать в митохондрии в результате генно-инженерных манипуляций. Более того, такая плазида, при помощи механизма гомологичной рекомбинации, может вызывать супрессию в митохондриальном геноме модельных организмов *S.cerevisiae*.

Было показано, что клетки человека содержат систему импорта нуклеиновых кислот в митохондрии, организованную аналогично хорошо изученной дрожжевой системе. Это наблюдение будет использовано для достижения целей ПНИ на следующих этапах работ. Одновременно показана возможность использования генетической конструкции в лабораторной практике при работе с культурами клеток человека.

Область применения результатов исследований

Полученные на этапе №2 ПНИ (промежуточном) результаты позволяют утверждать, что выбранный способ транспортировки белково-нуклеиновой конструкции, построенной на основе дрожжевого ДНК-связывающего белка Abf2p, через мембрану митохондрий позволит разработать новый метод механизмов супрессии мутаций в митохондриальном геноме. А также провести исследования методов и средств доставки генетической конструкции в митохондрии, разработать методики этой доставки и разработать методы оценки эффективности супрессии митохондриальных мутаций, предположительно «основной делеции» и провести работы, запланированные на последующих этапах ПНИ. Актуальность решаемой задачи остается очень высокой, так как она находится на стыке молекулярной биологии, биотехнологии, генетики, медицины и ветеринарии и предполагает получить положительные результаты в области лечения митохондриальных болезней. Новаторский подход к постановке данной задачи и способам ее решения позволяет планировать как новые патентные разработки, так и новые публикации на последующих этапах ПНИ.

Область применения результатов исследований:

Генетические конструкции, полученные в результате выполнения проекта, могут найти прямое применение в медицине, в частности, в лечении болезней человека, вызванных митохондриальными дисфункциями, а также в ветеринарии. Перспективы использования генетических конструкций для супрессии митохондриальных мутаций необыкновенно велики. Такие заболевания, как синдромы MERRF, MELAS или KSS в настоящее время практически не поддаются лечению. Наше исследование направлено на преодоление технологических и методологических трудностей в коррекции мутаций митохондриального генома.

Данный проект относится к разряду фундаментальных научных исследований, результаты которых могут оказать решающее значение на развитие науки молекулярной биологии. Разработка генно-терапевтических методов лечения нейродегенеративных заболеваний человека позволит начать новую эру и в медицине – лечения заболеваний человека, связанных с мутациями в ДНК. Проект позволит развивать международное научное сотрудничество в области митохондриальной медицины, формировать новые соответствующие объекты инфраструктуры.

Эффекты от внедрения результатов проекта

В результате окончательного исполнения задач ПНИ в 2016 году мы надеемся получить генетическую конструкцию для коррекции мутаций в митохондриальном геноме и, с их помощью, предложить генно-терапевтическое решение для лечения нейродегенеративных заболеваний человека. Данные инновационные механизмы лечения будут иметь большое значение в развитии отечественной медицины в целом и генной медицины в частности. Излечение болезней, в настоящее время считающихся неизлечимыми, приведет к снижению смертности, приведет к повышению уровня и качества жизни.

Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Разрабатываемые генные конструкции для корректировки митохондриальных дисфункций найдут широкое применение в современной медицине и ветеринарии. Основными потребителями полученных технологий будут клиники, специализирующиеся на лечении заболеваний, вызванных мутациями ДНК, а также различные биотехнологические и научно-исследовательские лаборатории, работающие в данном секторе.

Результаты второго этапа ПНИ были доложены на Северном симпозиуме по биологии митохондриальных РНК в Леви, Финляндия, и на Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» в Москве в апреле 2015 года. По результатам ПНИ вышла одна статья "A Moonlighting Human Protein Is Involved in Mitochondrial Import of tRNA" в журнале "International Journal of Molerular Sciences" (ISSN 1422-0067). Авторы статьи - исполнители настоящего проекта Каменский П.А. и Балева М.В. в соавторстве с коллегами (Maria Valeva, Ali Gowher, Piotr Kamenski, Ivan Tarassov, Nina Entelis and BenoTt Masquida)

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом: Использование средств субсидии в размере 2 700 000 (Два миллиона семьсот тысяч) рублей, предоставленных Получателю субсидии по Соглашению с Минобрнауки России от от 07.08.2014г. № 14.604.21.0113 на этапе № 2 Плана-графика исполнения обязательств условиям Соглашения с Минобрнауки России соответствует. Работы по Соглашению о предоставлении субсидии на этапе №2 Плана-графика исполнения обязательств выполнены в установленный срок и удовлетворяют условиям данного Соглашения, в том числе Техническому заданию и Плану-графику исполнения обязательств