

Краткое описание проекта

ПНИ «Разработка генетических конструкций для коррекции митохондриальных дисфункций»

Этап №3 (01.07.2015 – 31.12.2015)

по теме: РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И СРЕДСТВ РАБОТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ КАК СУПРЕССОРОВ 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. Исследованы методы и средства доставки генетической конструкции в митохондрии.
2. Разработана методика доставки генетической конструкции в митохондрии.
3. Исследованы методы и средства оценки эффективности генетической конструкции в митохондрии.
4. Разработана методика оценки эффективности доставки разработанной генетической конструкции в митохондрии.
5. Исследованы методы и средства оценки эффективности супрессии делеций в митохондриальном геноме, с помощью генетической конструкции.
6. Разработана методика оценки эффективности супрессии делеций в митохондриальном геноме, с помощью разработанной генетической конструкцией.

Выполнено материально-техническое обеспечение работ этапа

При этом были **получены следующие результаты:**

В первой части выполнения работ этапа №3 было выяснено, что предварительная конденсация ДНК рекомбинантным белком Abf2p влияет на ее импорт в митохондрии пекарских дрожжей *S. cerevisiae*. Более того, количественный анализ эффективности импорта показал, что эффективность импорта фрагментов линейной ДНК возрастает с 0,02% без обработки белком до 0,25% после обработки рекомбинантным Abf2p – более чем в 10 раз.

Полученные результаты позволили высказать предположение, что увеличение эффективности импорта после связывания с Abf2p определяется не общим соотношением числа молекул белка к числу молекул ДНК, а количеством молекул белка относительно числа сайтов его связывания на линейной молекуле импортируемой ДНК – 1 молекула белка на 4 сайта связывания на ДНК. В ходе исследования было показано, что увеличение эффективности импорта опосредовано не включением аппарата белкового импорта в митохондрии, а созданием локальной повышенной концентрации импортируемой ДНК у поверхности митохондрий за счет рекрутирования содержащих сигнал импорта в митохондрии молекул рекомбинантного белка, связанного с ДНК. При этом снижение эффективности импорта ДНК при увеличении числа молекул белка на сайт связывания, по всей видимости, опосредовано излишним снижением величины отрицательного заряда

ДНК, препятствующего поглощению ДНК митохондриями. Данные выводы носят фундаментальный характер и способствуют развитию теоретической науки, в частности молекулярной и клеточной биологии.

На основе результатов первого этапа работ была разработана «Методика доставки генетической конструкции в митохондрии».

Далее была проведена количественная оценка эффективности импорта генетической конструкции. Она показала, что в приведенных условиях способность ДНК к проникновению в митохондрии при ее предварительной обработке белком Abf2p в оптимальном соотношении (1 молекула белка на 4 сайта связывания на ДНК) не зависит от длины молекулы. Средняя эффективность импорта составляла 0,45% - 0,5% от количества внесенной в реакцию ДНК. Этот результат подтвердил высказанную ранее гипотезу о влиянии увеличения концентрации ДНК у поверхности митохондрий на эффективность импорта, и, что более важно, позволил использовать протяженные молекулы ДНК (от 4000 до 7100 п.н.) для их импорта в митохондрии с целью супрессии мутаций в мтДНК.

На базе результатов, полученных на двух первых этапах настоящего исследования, была разработана «Методика оценки эффективности доставки разработанной генетической конструкции в митохондрии».

На последней стадии этапа №3 были изучены возможности супрессии митохондриальной мутации по типу «делеция» методом гомологичной рекомбинации. Результаты, полученные при изучении гомологичной рекомбинации в модельной системе - штамме-делетанте СОВ-дельта, убедительно свидетельствуют о том, что гомологичная рекомбинация действительно происходит после направленного импорта генетической конструкции в изолированные митохондрии в том случае, если по краям находятся участки, гомологичные 5'-и 3'-областям соответствующего геномного локуса.

На основе данных последнего этапа исследований была разработана «Методика оценки эффективности супрессий делеций в митохондриальном геноме с помощью разработанной генетической конструкцией».

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 третьего этапа ПНИ были доложены на симпозиуме «Митохондрии на перепутье», Страсбург, Франция (21-22 сентября 2015 года) и на Азиатской конференции «Cold Spring Harbor, «Mitochondria 2015», Сучжоу, Китай.

По результатам третьего этапа ПНИ вышли две статьи: 1). «Импорт РНК в митохондрии и его применение в генной терапии» - в журнале «Вестник МГУ. Серия 16. Биология». Авторы - Лакунина В.А., Балева М.В., Каменский П.А. Левицкий С.А., Самойлова Е.О., Чичерин И.В., дата публикации 03.08.2015. 2). «Слияние и деление митохондрий» в журнале Биохимия. Авторы статьи - М.В. Патрушев, И.О. Мазунин, Е.Н. Виноградова, П.А. Каменский. Дата публикации 02.11.2015.

14 декабря 2015 года на основе полученных данных была подана Заявка на получение патента на изобретение № 2015153507 «Способ увеличения эффективности проникновения ДНК в митохондрии эукариотических клеток».

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 07.08.2014г. № 14.604.21.0113 на этапе № 3 Плана-графика исполнения обязательств условиям Соглашения с Минобрнауки России соответствует. Работы по Соглашению о предоставлении субсидии на этапе №3 Плана-графика исполнения обязательств выполнены в установленный срок и удовлетворяют условиям данного Соглашения, в том числе Техническому заданию и Плану-графику исполнения обязательств.