

## Краткое описание проекта для сайта Биофака этап №5

ПНИ «Разработка генетических конструкций для коррекции митохондриальных дисфункций»

Этап №5 (заключительный) (01.07.2016 – 31.12.2016)

По теме: **ОБОБЩЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ**

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 № 5 в период с 01 июля 2016 года по 31 декабря 2016 года в соответствии с «Планом - графиком исполнения обязательств» по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

1. Исследование функциональности экспериментального образца генетической конструкции, заложенного на хранение в осажденном виде при минус 20 градусах Цельсия и в лиофилизированном виде
2. Выполнение оценки полноты решения задачи и достижения поставленных целей ПНИ;
3. Разработка технических требований и предложений по разработке, производству и эксплуатации продукции с учетом технологических возможностей и особенностей индустриального партнера - организации реального сектора экономики;
4. Разработка проекта технического задания на проведение ОТР по теме «Разработка технологии супрессии мутаций в митохондриальном геноме.

При этом были **получены следующие результаты:**

В ходе выполнения работ были обоснованы требования к генетической конструкции для коррекции митохондриальных дисфункций. Генетическая конструкция представляет собой линейную двуцепочечную ДНК размером 5042 п.н. что практически соответствует размеру "основной делеции" в митохондриальном геноме человека. Установлено, что выбранная в результате теоретических работ генетическая конструкция проникает в изолированные митохондрии дрожжей, если она была предварительно связана с полноразмерным дрожжевым белком Abf2p. Показано, что клетки человека содержат систему импорта нуклеиновых кислот в митохондрии, организованную аналогично изученной дрожжевой системе.

Были разработаны и обоснованы методы и средства доставки генетической конструкции в митохондрии, методы и средства оценки эффективности доставки генетической конструкции в митохондрии, методы и средства оценки эффективности супрессии делеций в митохондриальном геноме с помощью генетической конструкции путем проведения процесса гомологичной рекомбинации. Нарботанная генетическая конструкция предназначена для коррекции митохондриальной дисфункции, вызываемой мутациями в митохондриальном геноме человека, в частности созданная генетическая конструкция может супрессировать мутацию известную под названием «основная делеция» размером 4977 п.н. (8483–13459), являющуюся причиной тяжелых наследственных заболеваний человека, объединенных под общим названием Синдром Кернса-Сейра (сокращенно KSS).

Разработан Лабораторный регламент получения экспериментальных образцов генетической конструкции, а также Технические требования и предложения по разработке, производству и эксплуатации продукции с учетом технологических возможностей и особенностей индустриального партнера - организации реального сектора экономики. Проведена разработка Проекта технического задания на проведение ОТП по теме «Разработка технологии супрессии мутаций в митохондриальном геноме». Проведены испытания образца генетической конструкции, заложенной на хранение в осажденном виде при +4 С на 1 месяц. На последнем этапе ПНИ проведено испытание функциональности образца генетической конструкции, снятой с хранения в лиофилизированном виде при температуре +20 С и в осажденном виде при температуре -20 С. Показано, что при всех видах хранения от 1 месяца до 7 месяцев потери функциональности генетической конструкции не происходит.

1). Нарботанная генетическая конструкция - продукт ПЦР, линейная ДНК, размером 5042 п.н, соответствующая области митохондриального генома, удаляющейся из него в результате «основной делеции». Итоговый размер ДНК 3227 кДа. В ходе испытаний выявлено, что после проникновения генетической конструкции в клетки человека происходит восстановление параметров митохондриальных функций: снижается на 49% уровень гетероплазмии и на 370 % увеличивается скорость поглощения кислорода.

Испытания генетической конструкции, заложенной на хранение на 1 месяц в осажденном виде при +4С подтверждают сохранение её функциональности: гетероплазмия снижается на 45%, а поглощение кислорода увеличивается на 360%. При исследовании функциональности генетической конструкции, снятой с хранения через 7 месяцев было установлено: для лиофилизированного образца - гетероплазмия снижается на 45%, а поглощение кислорода увеличивается на 360%, для осажденного спиртом образца - гетероплазмия снижается на 45%, а поглощение кислорода увеличивается на 360%. Ее детекция в митохондриях производилась методами радиоавтографии.

2). После хранения в течение 7 месяцев генетическая конструкция обеспечивала снижение уровня гетероплазмии: образец «А» - лиофилизированная форма, хранение при комнатной температуре - на 49% и образец «С» - осажденная форма, хранение при -20 градусах Цельсия - на 48%.

После хранения генетическая конструкция обеспечивала увеличение скорости поглощения кислорода: образец «А» на 295% и образец «С» на 268%.

3). Генетическая конструкция разработана при помощи современных методов генетической инженерии, а выбранный способ доставки белково-нуклеиновой конструкции через мембрану митохондрий позволит создать новаторский метод корректировки механизмов супрессии мутаций в митохондриальном геноме.

4). Полученные теоретические и экспериментальные результаты пяти этапов ПНИ полностью удовлетворяют техническим требованиям проекта, а также дало нам возможность полностью выполнить данное исследование согласно плану–графику и техническому заданию Соглашения о предоставлении субсидии.

5.) Настоящие исследования и результаты экспериментальной части соответствуют уровню мировых аналогов, что подтверждается их публикацией в международных научных журналах

**Область применения результатов исследований:**

- 1) Генетическая конструкция, наработанная в результате выполнения проекта, может найти применение в медицине, в частности, в лечении болезней человека, вызванных митохондриальными дисфункциями, а также в ветеринарии.
- 2) Перспективы использования генетических конструкций для супрессии митохондриальных мутаций на сегодняшний день представляются довольно обширными. Такие заболевания, как синдромы MERRF, MELAS или KSS в настоящее время практически не поддаются лечению. Наше исследование позволит сделать первый шаг по пути лечения заболеваний объединенных под общим названием Синдром Кернс-Сейр (сокращенно KSS)
- 3) 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 показано, что наработанная генетическая конструкция для коррекции мутаций в митохондриальном геноме полностью соответствует требованиям ТЗ и обладает всеми необходимыми свойствами для геннотерапевтического 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**

В настоящий момент рассчитать экономический эффект в денежном эквиваленте не представляется возможным, так как работы по внедрению данных разработок в практику еще далеки от полного завершения. Тем не менее, нужно отметить безусловную важность настоящих исследований, так как они являются перспективными для лечения всей серии генетических заболеваний, как связанных с мутациями мтДНК, так и с дефектами ядерной ДНК.

Потенциальная потребность в генетических конструкциях для коррекции митохондриальной дисфункции составляет около одной на 50000 человек, что в мировом масштабе составляет около 150000 штук. Импортные аналоги генетической конструкции отсутствуют, тем важнее является разработка отечественных изделий, которые способны занять множество мировых рынков. Генетические конструкции для коррекции митохондриальной дисфункции при их внедрении в медицинскую практику приведут к существенному увеличению качества жизни населения. Стоимость симптоматического медикаментозного лечения пациентов с митохондриальными дисфункциями может составлять до 5 млн рублей в год. Использование генетических конструкций для коррекции митохондриальной дисфункции вместо традиционного лечения позволит

достигнуть суммарного готового экономического эффекта в масштабах России до 1 млрд рублей.

**Результаты четвертого этапа ПНИ были опубликованы в научных журналах и доложены на конференциях:**

1. «Связывание ДНК белком Abf2p увеличивает эффективность её проникновения в изолированные митохондрии», Авторы - Е.О. Самойлова, И.А. Крашенинников, Е.Н.

Виноградова, П.А. Каменский\*, С.А. Левицкий, Биохимия, 2016, том 81, вып. 7, с.953-961.

Принято в печать 23.03.16

2. «Способ выделения рекомбинантного белка preMsk1p из клеток *E. Coli* определяет его свойства как фактора импорта тРНК в митохондрии дрожжей», Авторы - Е.В.

Смирнова, И.В. Чичерин, М.В. Балева, Н. Энтелис, И. Тарасов, П.А. Каменский.

Биохимия, 2016, том 81, вып. 10, с. 1349 – 1358. Принято в печать 23.05.16

3. «Взаимодействие митохондриального ДНК-связывающего белка *Saccharomyces cerevisiae* Abf2p с резольвазой Cse1p», Авторы - Е.О. Самойлова, И.А. Крашенинников,

С.А. Левицкий, Биохимия, 2016, том 81, вып 10, с.1383 – 1391. Принято в печать 19.07.16

Результаты проекта были доложены на следующих Российских и зарубежных мероприятиях по демонстрации и популяризации результатов и достижений науки:

1). Молодежный научный Форум «Open Science 2016», г. Гатчина с 16 по 18 ноября 2016 года, стендовый доклад «Белок Abf2p увеличивает эффективность импорта ДНК в изолированные митохондрии».