

# **Разработка методов редактирования генома при нейромышечных заболеваниях в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы**

## **Актуальность исследования**

Наследственные нервно-мышечные заболевания, и ассоциированные с кардиомиопатиями, являются наиболее трудным разделом клинической неврологии и кардиологии. Несмотря на прогресс в генетической диагностике данной группы заболеваний, связанный с внедрением технологии секвенирования нового поколения, применение методов геномной, клеточной, фермент-замещающей и протеин-модифицирующей терапии носят ограниченный характер, имеются лишь единичные сообщения о проведении клинических испытаний генно-инженерных препаратов в данной области. Причиной ограниченного развития генно-инженерных терапевтических подходов в данной области является сложный генетический спектр нейромышечной патологии (более 100 различных генов), отсутствие надежных клеточных моделей миогенной дифференцировки *in vitro* для тестирования генно-инженерных подходов, малое количество экспериментальных животных моделей и нокаутных линий животных, различия в изоформах мажорных миоцитарных белков между человеком и грызунами, сложность и неспецифичность спектра тканевых морфологических изменений при миопатиях и миодистрофиях. Наиболее современными подходами для коррекции врожденных генетических нарушений сегодня являются технологии редактирования генома с использованием технологий CRISPR/Cas9 и TALEN. Данный проект направлен на разработку новых подходов для терапии наследственных нервно-мышечных заболеваний с использованием наиболее современных подходов геномной инженерии – технологии CRISPR/Cas9.

## **Научная платформа**

ИННОВАЦИОННЫЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

## **Научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)**

Руководитель исследования – директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России Костарева А. А.

Исполнители:

НИИ неврологии

НИИ молекулярной кардиологии и генетики

Группа клеточной биологии

Отдел патоморфологии

Отдел магнитно-резонансной томографии

Кафедра клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им.

В.А.Алмазова" Минздрава России

НИО некоронарогенных заболеваний сердца

## **Ключевые слова**

Нервно-мышечные заболевания, редактирование генома, CRISPR/Cas9, клонирование, мутации генов, орфанные болезни, кардиомиопатии, секвенирование нового поколения,

## **Цель проекта**

Разработать генно-инженерные подходы с использованием технологии CRISPR/Cas9 для коррекции генетических нарушений, лежащих в основе развития нейромышечных заболеваний в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы.

## Задачи проекта

1. С помощью современных технологий молекулярно-генетического анализа, в частности, технологии таргетного секвенирования нового поколения, охарактеризовать спектр генетических причин различных миопатий и мышечных дистрофий в сочетании с кардиомиопатиями в детской и взрослой возрастных группах.
2. Разработать протокол создания трех генно-инженерных конструкций на основе технологии CRISPR/Cas9 для редактирования генетических нарушений, выявленных в качестве причин миопатий и миодистрофий в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы.
3. Выделить и охарактеризовать первичные линии клеток-предшественников мышечных клеток, полученных от пациентов с известными генетическими причинами миопатий и миодистрофий в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы.
4. С использованием линии мышей mdx, несущих мутацию в гене дистрофина, разработать методику получения мышечных стромальных клеток-предшественников.
5. Апробировать эффективность технологии CRISPR/Cas9 и созданных на ее основе генно-инженерных конструкций на первичных линиях клеток-предшественников мышечных клеток человека в недифференцированном состоянии и в процессе их миогенной дифференцировки.
6. Создать линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека от пациентов с известными генетическими причинами миопатий и миодистрофий и разработать подходы для их миогенной дифференцировки с целью последующего тестирования эффективности технологии CRISPR/Cas9 и созданных на ее основе генно-инженерных конструкций
7. Охарактеризовать основные мишени сигнальных путей, ответственных за развитие воспаления при кардиомиопатиях
8. Разработать протокол создания генно-инженерных конструкций на основе технологии CRISPR/Cas9 для предотвращения стерильного воспаления в мышечной ткани, вызванного кардиомиопатиями

## Достигнутые результаты проекта

В результате работ по проекту был произведён выбор основных генов-мишеней, являющихся главными регуляторами биогенеза митохондрий – *TFAM*, *NRF1*, *PPARGC1A*. С помощью биоинформатического анализа были подобраны последовательности направляющие гид-РНК, специфичные к промоторам вышеуказанных генов. Синтезированные олигонуклеотидные последовательности гид-РНК были клонированы в лентивирусный вектор, позволяющий с высокой эффективностью доставлять и экспрессировать гид-РНК в клетке. На основе полученных векторов и других компонентов системы CRISPR/Cas9 активации генов были собраны лентивирусные частицы и осуществлена трансдукция клеток линии НЕК293Т. Анализ экспрессии генов-регуляторов биогенеза митохондрий методом ПЦР в режиме реального времени позволил выявить те гид-РНК или их комбинации, введение которых в клетку приводило к наибольшему повышению экспрессии соответствующих генов. С учётом полученных данных была осуществлена продукция и концентрация вирусных частиц, несущих соответствующие последовательности гид-РНК с последующей трансдукцией и селекцией клеток НЕК293Т. Анализ экспрессии генов-регуляторов биогенеза митохондрий показал, что выбранные гид-РНК с высокой эффективностью повышают экспрессию этих генов. Наибольшего повышения экспрессии удалось добиться, применяя комбинацию гид-РНК специфичных к последовательностям промоторов генов *TFAM*, *NRF1*, *PPARGC1A*. В перспективе применение созданной системы позволит существенно улучшать функцию митохондрий в клетках, полученных от пациентов с нервно-мышечными патологиями. Также были получены линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с кардиомиопатиями, осуществлена их характеристика и банкирование.

## **Ожидаемые результаты проекта**

В результате проекта будут получены новые фундаментальные знания об этиологии, патогенезе, клинике развития миопатий и ассоциированных кардиомиопатий.

Практическими результатами проекта будут являться:

- протокол молекулярно-генетического тестирования при миопатиях и миодистрофиях;
- протокол создания генно-инженерных конструкций на основе технологии CRISPR/Cas9 для коррекции генетических нарушений;
- протокол выделения и характеристики первичных линий клеток-предшественников мышечных клеток, полученных от пациентов с известными генетическими причинами миопатий и миодистрофий в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы;
- протокол тестирования технологии CRISPR/Cas9 и созданных на ее основе генно-инженерных конструкций на первичных линиях клеток-предшественников мышечных клеток человека в недифференцированном состоянии и в процессе их миогенной дифференцировки;
- протокол индукции и предотвращения воспаления в мышечных клетках на основе системы CRISPR/Cas9

## **Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта**

Результаты исследования будут введены в клиническую практику неврологических стационаров в качестве протоколов генетической диагностики, а также могут быть использованы с клиниках смежных профилей – педиатрии, кардиологии. Результаты определения спектра генетических причин при миопатиях и миодистрофиях могут быть использованы в работе медико-генетических центров и при проведении медико-генетического семейного консультирования. Разработанные методики получения линии клеток-предшественников мышечных клеток, полученных от пациентов с известными генетическими причинами миопатий и миодистрофий и мышечных стромальных клеток-предшественников в моделях трансгенных животных будут использоваться для дальнейшего изучения и моделирования патогенеза заболевания *in vitro*.

## **Описание научного исследования**

Из клинической когорты пациентов с кардиомиопатиями будут отобраны пациенты, имеющие признаки нейромышечного заболевания. На данной группе пациентов будет проведено секвенирование ДНК с применением технологии секвенирования нового поколения. У пациентов с невыявленными генетическими причинами (ламин, дистрофин, десмин) будет проведено экзомное секвенирование для поиска новых причинных генов. У ряда пациентов с кардиомиопатиями и миопатиями из материала скелетно-мышечной биопсии будут выделены миогенные клетки-предшественники, оптимизирован протокол их выделения и дифференцировки.

С учетом выявленных мутаций будут определены гены и сигнальные пути, генетическая модификация которых может являться перспективной с позиции генной терапии. На основе выбранных генов-мишеней (функционирование митохондрий, процесс асептического воспаления) будут созданы генно-инженерных конструкций с использованием технологии CRISPR/Cas9 на основе уже имеющихся и используемых в лаборатории плазмид и вирусных носителей CRISPR/Cas9. В модифицированных с их помощью клеточных линиях будут оценены функция митохондрий, жизнеспособность клеток и маркеры активации внутриклеточного воспаления. Будут определены наиболее перспективные конструкции для дальнейшего использования в экспериментальных моделях животных с нейромышечной патологией. Разработанные генно-инженерные подходы будут использоваться для дальнейшего изучения и моделирования патогенеза заболевания *in vitro*.

## Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

1. Клиническая характеристика пациентов с миопатиями и миодистрофиями. В настоящее время верификация (диагностика) наследственных миопатий и кардиомиопатий требует применения комплексного подхода с использованием методов молекулярной генетики и данных морфологии скелетных мышц и миокарда. Внедрение в клиническую практику современных методов лечения (генной, клеточной, энзимзамещающей терапии) требует надежных способов верификации эффективности лечебного процесса. Для решения этой задачи широко используются неинвазивные технологии позволяющие мониторировать течение основных патологических механизмов заболевания, для чего используются такие технологии как методы количественной и качественной МРТ диагностики скелетных мышц и сердца, МРТ спектроскопии.
2. Идентификация генетических причин миопатий и миодистрофий с использованием технологии секвенирования нового поколения. В частности, будет использован прибор Illumina MiSeq (набор для запуска 600 циклов, версия 3) и метод целевого обогащения фракций генома (наборы для целевого обогащения 500 mb Haloplex, Agilent).
3. Получения генно-инженерных конструкций с использованием технологии CRISPR/Cas9 будет проводиться на основе уже имеющихся и используемых в лаборатории плазмид и вирусных носителей CRISPR/Cas9: выбор целевой нуклеотидной последовательности, клонирование таргетного участка гена в вектор и создание нуклеазной конструкции, направленный муагенез in vitro, отбор клонов с помощью бактериальной селекции, выделение плазмидной ДНК коммерческими наборами, секвенирование клонов методом Сенгера на приборе ABI Prism 3500. Перед созданием нуклеазной конструкции будет проведен биоинформатический анализ с целью оптимального выбора мест разрыва ДНК и минимизации нецелевых эффектов.
4. Биопсия скелетно-мышечного лоскута пациента, проводимая в диагностических целях (морфологическое и иммуногистохимическое исследование) будет использована для энзиматического получения первичных линий клеток-предшественников мышечных клеток. Полученные клеточные линии будут фенотипированы и отсортированы методом проточной цитометрии (FACS Calibur, клеточный сортер Aria, BD). Их способность к направленной миогенной дифференцировке будет подтверждаться наличием структурных мышечных белков и транскрипционных факторов (MEF, myogenin, MyoD, легкие цепи миозина, тропонин Т скелетных мышц), а также наличием структуры саркомера при иммуноокрашивании и характерных для мышечных клеток поверхностных кальциевых ионных каналов (whole-cell patch clamp).
5. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека от пациентов с известными генетическими причинами миопатий и миодистрофий будет происходить путем репрограммирования ММСК жировой ткани, мезенхимных клеток сердца или мононуклеарных клеток периферической крови при помощи трансдукции их помощью вирусами Сендай, несущими «коктейль Яманаки» (Cyto Tune 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies, США)). иПСК будут культивироваться на фидерном слое мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ), полученных из 14-суточных мышечных эмбрионов линии DBA/2JxBalb/c. Направленная дифференцировка в кардиогенном направлении будет проводиться методом сокультивирования их с клеточной линией END-2, согласно описанной ранее методике (Mummary et al., 2003). Отработка методов направленной дифференцировки в миогенном направлении будет проводиться с помощью метода экзогенной индукции экспрессии MyoD и путем использования малых молекул.
6. Апробирование эффективности технологии CRISPR/Cas9 и созданных на ее основе генно-инженерных конструкций на первичных линиях клеток-предшественников мышечных клеток человека, мышечных клетках мыши (линия C2C12), клетках мышечных стромальных клеток-предшественников и иПСК будет проводиться путем вирусной трансдукции клеток созданными генетическими конструкциями, селекции клонов,

выделения геномной ДНК и секвенирования по Сенгеру для идентификации мутации/коррекции мутации.