

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН  
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2018-0009

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690132-6

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН  
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН  
А.В. Васильев  
«10» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА БИМЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОРРЕКЦИИ СИМПТОМОВ  
БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА, ОСНОВАННОЙ НА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ  
АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК

по Программе Президиума РАН № 42  
«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»  
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,  
главный научн. сотр.,  
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

 06.12.18

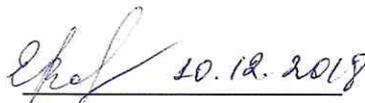
Е.А. Воротеляк

подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

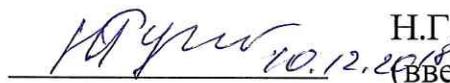
Руководитель работ, зав.  
лаб., д.б.н., чл.-корр. РАН.

  
10.12.2018  
подпись, дата

Е.А. Воротеяк  
(документ в целом)

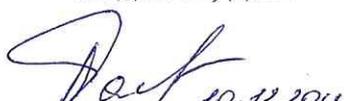
Исполнители темы:

Старший научный  
сотрудник, к.б.н.

  
10.12.2018  
подпись, дата

Н.Г. Гурская  
(введение, раздел  
1.1.)

Старший научный  
сотрудник, к.б.н.

  
10.12.2018  
подпись, дата

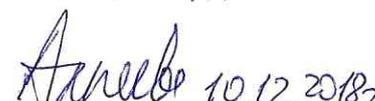
Э.Б. Дашинимаев  
(подраздел 1.1.2)

Научный сотрудник, к.б.н.

  
10.12.2018  
подпись, дата

О.С. Роговая  
(раздел 1.2)

Научный сотрудник, к.б.н.

  
10.12.2018  
подпись, дата

Е.В. Алпеева  
(подраздел 1.1)

Аспирант

  
10.12.2018  
подпись, дата

А.К. Бейлин  
(разделы 1.1, 1.2)

Аспирант

  
10.12.2018  
подпись, дата

М.А. Борисов  
(подраздел 1.1.2)

Инженер

  
10.12.2018  
подпись, дата

О.В. Борисова  
(раздел 1.1.1)

Лаборант

  
10.12.2018  
подпись, дата

Я. И. Лучинина  
(подраздел 1.2.1)

Нормоконтроль, ведущий  
научный сотрудник, к.б.н.

  
06.12.2018  
подпись, дата

Е.Б. Абрамова

## РЕФЕРАТ

Отчёт 24 с., 6 ч., 12 рис., 1 табл., 13 источников, публикаций по теме - 4.

БУЛЛЁЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ, ПРОСТОЙ БУЛЛЁЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ, КЕРАТИНОЦИТЫ, КОЖА, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ, CRISPR/CAS9, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, ЭПИДЕРМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, КОЖА ЧЕЛОВЕКА, КЛОНИРОВАНИЕ, ЦИТОКЕРАТИН 5, KRT5, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ, ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ, КОЖНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ, FACS, ИММУНОЦИТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК, КОНТРАКЦИЯ, МИГРАЦИЯ, РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ, КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ, ИММОРТАЛИЗОВАННЫЕ КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА, НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК, СЕКВЕНИРОВАНИЕ.

Объектом исследования являются клетки человека от здоровых доноров, а также несущие мутации, определяющие развитие орфанного наследственного генетического заболевания буллёзный эпидермолиз (БЭ), а также генетические конструкции для геномного редактирования клеток человека.

Цель проекта – разработка принципиально новой генетической конструкции, предназначенной для коррекции симптомов БЭ в клетках пациентов.

Получены клеточные линии, моделирующие простой БЭ (ПБЭ) *in vitro*. Разработаны направляющие РНК для системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, позволяющие вносить целевые изменения в ген KRT5, кодирующий цитокератин 5, мутации в котором вызывают ПБЭ. Получен лентивирусный вектор, несущий копию гена KRT5 с мутацией ПБЭ. Получены линии иммортализованных кератиноцитов человека (HaCaT), несущие мутации характерные для ПБЭ. Клеточные линии с ПБЭ показывают фенотипические изменения в структуре цитокератиновой сети при стрессовом воздействии по сравнению со здоровыми клетками. Были отработаны тесты, оценивающие способность клеток к перестройке внеклеточного матрикса, их миграционную активность и скорость ранозаживления. Мутантные линии были охарактеризованы методами секвенирования, и природа мутации была подтверждена. Разработан протокол получения эквивалентов кожи из мутантных клеток для оценки их способности реконструировать базальную мембрану.

Полученные результаты создают новые возможности для эффективного развития технологий в геномном редактировании и биомедицине.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
1. Создание модели простого буллёзного эпидермолиза в NaCaT	8
1.1. Материалы и методы	8
1.2. Результаты и обсуждение	11
1.1.3 Заключение	19
2 Разработка метода создания живого эквивалента кожи для анализа способности клеток к формированию структур базальной мембраны	20
2.1 Материалы и методы	20
2.2 Результаты и обсуждение	21
2.3 Заключение	21
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	22
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ	24

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчёте применяют следующие термины, обозначения и сокращения:

БЭ – буллёзный эпидермолиз

ПБЭ – простой буллёзный эпидермолиз

CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) - особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами).

Cas9 - CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок

FACS - fluorescence-activated cell sorting – сортировка клеток с активированной флуоресценцией

KRT5 – ген, кодирующий белок кератина 5

ВКМ - внеклеточный матрикс

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

СК - стволовые клетки

ТФ - транскрипционные факторы

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

HaCaT – линия иммортализованных кератиноцитов человека

3Т3 – линия иммортализованных фибробластов мыши

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЖЭК – живой эквивалент кожи

## ВВЕДЕНИЕ

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) – это гетерогенная группа редких генодерматозов, при которых наблюдается высокая чувствительность к небольшим механическим воздействиям. Клинически заболевание проявляется в виде появления пузырей и эрозий, возникающих на коже и слизистых оболочках после незначительной травмы или даже без нее. Эти поражения возникают вследствие генетически обусловленных дефектов структурных белков кожи, обеспечивающих интраэпидермальные или дермоэпидермальные связи [1]. К основным типам ВБЭ относят простой буллезный эпидермолиз (ПБЭ), пограничный буллезный эпидермолиз (ПоБЭ) и дистрофический буллезный эпидермолиз (ДБЭ); последний подразделяется на доминантный ДБЭ (ДДБЭ) и рецессивный ДБЭ (РДБЭ). Отдельно выделяют синдром Киндлер [2].

Для каждого из типов болезни были выявлены гены, мутации в которых ответственны за приобретение фенотипа ВБЭ. В настоящее время известно, как минимум 18 генов структурных белков кожи и более 1000 мутаций в них, ассоциированных с развитием клинических проявлений того или иного типа ВБЭ [3–5]. Для обеих форм ДБЭ – это повреждения гена COL7A1, кодирующего коллаген VII типа (C7), для ПоБЭ – это мутации генов, вовлеченных в образование ламинина 322 и интегрина  $\alpha\beta 4$ , а также гена COL17A1, для ПБЭ – повреждения генов KRT5 и KRT14, а также PLEC.

Эффективной терапии больные ВБЭ не получают в силу генетической природы данного заболевания [6]. Однако в настоящее время появляются методы, позволяющие подойти ближе к решению вопроса об эффективном и доступном лечении ВБЭ [7]. Основные исследуемые варианты терапии ВБЭ можно условно разделить на две группы стратегий – *ex vivo* и *in vivo*. Стратегия *ex vivo* включает в себя культивирование первичных клеточных линий, полученных из биоптатов кожи больного, генетическую коррекцию культивируемых клеток и аутологичную трансплантацию трансгенного эквивалента кожи. Важным условием успеха функциональной терапии является наличие в первичных культурах эпидермальных стволовых клеток, поскольку генетическая коррекция этих клеток имеет решающее значение для обеспечения долговременного терапевтического эффекта от аутологичной трансплантации. Получение ИПСК из соматических дифференцированных клеток кожи больных обеспечивает неограниченный ресурс для последующей генетической модификации, дифференцировки и пополнения популяции генетически скорректированных клеток. Генетическая терапия аутологичных клеток пациентов с ВБЭ может быть выполнена с помощью разных методов. Наиболее перспективные из них – замещение гена с помощью вирусов, редактирование генов с

помощью программируемых нуклеаз и РНК-терапия. Коррекция мутаций предполагает доставку экзогенной кассеты, модифицирующей ген, в клетки-мишени. Низкая эффективность доставки генетического материала в клетки является важным фактором, ограничивающим эффективность методов функциональной терапии *ex vivo*. По способу доставки методы делятся на группы, использующие вирусные системы и невирусные искусственные векторные системы. Подробнее с методами генетической коррекции ВБЭ можно ознакомиться в обзоре [8].

В связи с редкостью заболевания и гетерогенностью его проявлений, клинические испытания новых способов лечения сильно затруднены, а животные модели дороги и обладают низкой воспроизводимостью результатов на людях. В такой ситуации различные клеточные модели обладают преимуществом, т.к. создаются из клеток человека, позволяют создавать персонализированный подход и получать статистически достаточное количество данных при сравнительно небольших затратах. Использование immortalized клеточных линий позволяет упростить процедуру культивирования и повысить воспроизводимость результатов, что особенно важно на первых этапах разработки новых методов лечения. Используемая в данной работе линия immortalized кератиноцитов человека HaCaT является хорошо известной и изученной. Данные клетки во многом отражают свойства базальных кератиноцитов, что позволяет использовать их в качестве модельного объекта. Полученные в данной работе линии HaCaT с мутациями в гене KRT5 показывают свойства сходные с теми, что были показаны для кератиноцитов, полученных от больных ПБЭ. Такая модель позволит в будущем оценивать свойства разрабатываемых генетических конструкций, методы их доставки в клетки и эффективность исправления мутаций, перед тем как использовать их на сильно ограниченном донорском материале.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Создание модели простого буллёзного эпидермолиза в HaCaT

Врожденный БЭ принадлежит к группе неизлечимых генодерматозов, единственная доступная терапия, применяемая в настоящее время, является симптоматическим лечением. В связи с этим использование генетической терапии с применением программируемых нуклеаз (TALEN доменов и систем CRISPR/Cas9) открывает новые перспективы создания эффективного лечения этой группы заболеваний.

#### 1.1. Материалы и методы

##### **Культуры клеток**

В работе на данном этапе использовали иммортализованные кератиноциты человека HaCaT RT3, а также линии, стабильно экспрессирующие Cas9. Культуры клеток HaCaT RT3 Cas9 были получены с помощью трансфекции плазмидой *Sleeping Beauty* (SB), содержащей ген spCas9 под контролем CMV-промотора, а также культура клеток HaCaT RT3, стабильно экспрессирующая Cas9 v2 GFP, полученная с помощью лентивирусной трансдукции pLentiCRISPRv2 GFP.

##### **Клонирование направляющих РНК (gRNA), донорной ДНК**

В экспериментах по редактированию *krt5* мы использовали 4 разные специфические гидовые РНК (sgRNA), комплементарные фрагментам экзона 7 *krt5*. С помощью онлайн ресурса [crispr.mit.edu](http://crispr.mit.edu) были выбраны следующие последовательности синтетических олигонуклеотидов для получения специфических направляющих РНК:

Направляющая РНК 1: agctggccctggacgtgga

Направляющая РНК 2: cagcagcttgcgtaagt

Направляющая РНК 3: cctccagcagcttgcgtaagt

Направляющая РНК 4: gccacttaccgcaagctgc

В геномном редактировании использовали 2 варианта нуклеазы Cas9: spCas9 и ее мутантный вариант, никазу, Cas9D10A. В эксперименте с никазой использовали пару направляющих РНК (1 и 3), комплементарных разным цепям ДНК, и донорную ДНК в двухцепочечной форме. Донорная ДНК представляла собой фрагмент экзона 7, но при этом содержала мутацию K472X, встречающуюся при буллёжном эпидермолизе простого типа.

Используемые плазмиды

pSpCas9-IRES-EGFP (Evrogen)

pLentiCRISPRv2 GFP

pT2/НВ Cas9; SB100

pSpCas9n(BB)-2A-EGFP (Addgene #48140)

pU6-gRNA

pAL2-T (Evrogen)

### **Культура клеток и трансфекция**

Для временной трансфекции клеток использовали липофекцию с помощью липофектамина 2000 и 3000 (Thermo Fisher Scientific) и электропорацию на приборе Micro Pulser Electroporator (Bio-Rad).

### **Проточная цитофлуориметрия**

Для отбора трансфицированных клеток использовали метод проточной цитофлуориметрии, отбирая EGFP<sup>+</sup> клетки, поскольку плазмиды с Cas9 содержали ген EGFP. Отобранные клоны мы выращивали до получения  $10^6$  клеток и анализировали на эффективность процесса редактирования. Отдельно проводили отбор единичных клонов методом предельных разведений.

### **Молекулярно-генетические методы анализа**

*1. Выделение геномной ДНК.* Мы выделяли геномную ДНК с помощью стандартного метода экстракции фенол-хлороформом и последующим осаждением изопропаноловым спиртом.

*2. Полимеразная цепная реакция.*

Состав реакции: Матрица – 100 нг

Праймеры (10 мМ) – по 0,5 мкл

10xПЦР буфер (100 мМ KCl, 200 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 100 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1%

Triton X-100) – 2 мкл Смесь dNTP (10 мМ каждого) – 0,5 мкл

Taq-полимераза (5 ед./мкл) – 0,5 мкл

MilliQ H<sub>2</sub>O – до 20 мкл

Аmplификацию проводили на термоциклере S1000 (Bio-Rad) с использованием следующей программы – предварительная денатурация 95°C, 30 с, далее от 20 до 30 циклов (в зависимости от задачи): 1. Денатурация 95°C, 10 с; 2. Отжиг праймеров, 30 с; 3. Элонгация 72°C, 60 с/1 т.п.н.

### **Анализ эффективности редактирования**

*1. Идентификация мутаций*

Для идентификации мутаций (делеций и инсерций) выделяли геномную ДНК из смеси клонов, полученных из суммарной популяции клеток, прошедших стадию отбора на проточном цитофлуориметре. Проводили амплификацию с помощью набора ПЦР ScreenMix (Evrogen) по протоколу производителя. Для амплификации использовали

олигонуклеотидные праймеры, специфические к krt5: gaaactcagaaggagacacc; aagtcactgatctcatgtatgtgtg.

## *2. Качественный анализ активности системы CRISPR/Cas9 в целевых сайтах*

Анализ с помощью эндонуклеазы I фага T7 проводили, как описано ранее (Reyonetal., 2012). Продукт ПЦР денатурировали при 95°C, затем снижали температуру до 25°C со скоростью 0,3°C/с. Образовавшиеся гетеродуплексы подвергали гидролизу с помощью эндонуклеазы I фага T7 (T7 Endonuclease I, New England Biolabs, M0302S). Результаты анализа визуализировали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле.

После селекции отдельных клонов методом предельных разведений (требовалось от 2 до 4 недель роста в культуральных плашках), выделяли ДНК и анализировали, как описано выше. Для более подробного анализа клонов, прошедших редактирование генома, использовали: HRM-PCR (анализ кривых плавления с высоким разрешением) и цифровой капельный ПЦР (ddPCR). Для цифрового капельного ПЦР использовали следующие флуоресцентно-меченные зонды:

FAMprimer: ctggacgtggagatcgcca

R6Gprimer: ctgtagtgcgccaatctgca

*3. Секвенирование ДНК.* Секвенирование образцов ДНК некоторых выбранных клонов проводили методом Сэнгера после клонирования фрагментов ДНК в вектор pALT2. Мы использовали также анализ с помощью высокопроизводительного секвенирования HiSeq. Было получено более 300000 прочтений и произведен биоинформатический анализ с помощью пакета программ CRISPResso.

## **Создание стрессовых условий культивирования.**

Для создания стрессового воздействия на сеть промежуточных филаментов использовали два метода – осмотический шок и тепловой шок.

Осмотический шок осуществлялся помещением клеток в среду с мочевиной в концентрации 200 мМ.

Тепловой шок осуществлялся нагреванием клеток в культуральной посуде на водяной бане при температуре 47°C.

## **Иммуноцитохимическое окрашивание.**

Для иммуноцитохимического анализа клетки фиксировали 10% формалином по стандартному протоколу.

Окраска антителами производилась по стандартному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя антител. В работе использовались антитела против цитокератина 5 (Abcam, ab207351) и ядерный краситель Hoechst 33342 (ThermoFisherScientific, R37165)

## **Микроскопическое исследование.**

Микроскопический анализ препаратов и фотографирование производилось с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 800 и автоматического микроскопа EVOSFLAuto.

### 1.2. Результаты и обсуждение

Целью данной работы была разработка модельной системы ВБЭ с нарушенной сетью цитокератинов. Для введения инсерций и делеций (indels) в ген *krt5* иммортализованных HaCat RT3 использовали CRISPR/Cas9 систему. Данные клетки были выбраны в качестве модели, поскольку они легко культивируются и трансфицируются, экспрессируют цитокератины базального слоя кожи (в частности, KRT5), способны к образованию 3D структур подобных многослойным эквивалентам кожи. Для направленного введения изменений мы выбрали экзон 7 гена *krt5*, точнее его фрагмент, содержащий консервативный мотив аминокислот KLLEGE.

Геномное редактирование проводили с помощью трансфекции плазмидами, содержащими Cas9 (или Cas9N – мутантный вариант, содержащий замену D10A) и плазмидами, кодирующими направляющие РНК. В первом эксперименте (с Cas9) планировали получить набор инсерций и делеций в последовательности экзона 7, во втором эксперименте (с нисказой) использовали котрансфекцию с ДНК–донором, содержащим специфическую для ПБЭ мутацию K472X, приводящую к появлению укороченного белка [9], зарегистрированную в базе данных ClinvarNM\_000424.3(KRT5):c.1414A>T (p.Lys472Ter). После трансфекции и отбора клонов с помощью проточной цитофлуорометрии смесь клонов анализировалась на наличие мутаций с помощью ПЦР. ДНК после амплификации (ампликон экзона 7) подвергалась анализу с помощью рекомбинантной T7E1. Затем отобранные из смеси единичные клоны подвергали дальнейшему анализу с помощью разных методов ПЦР. Использование капиллярного электрофореза продуктов ПЦР с меченым FAM зондом привело к выявлению таких клонов в смеси, которые содержат инсерции и делеции. Данные результаты мы подтверждали с помощью ПЦР анализа с высокой разрешающей способностью кривой плавления (HRM-PCR), а также цифровой капельной ПЦР (ddPCR). В клонах, предположительно содержащих мутации, мы подтверждали их наличие секвенированием по методу Сэнгера. На рисунке 1.2.1 приведено выравнивание последовательностей одного из мутантных клонов с исходной последовательностью *krt5*. Были обнаружены клоны, содержащие в данном гене делецию в интересующей нас области. Эта делеция привела к устранению мотива KLLEGE из последовательности

KRT5. Среди полученных вариантов была обнаружена мутация, описанная при ПБЭ типа NM\_000424.3(KRT5):c.591C>A (p.Asp197Glu), аллель ID 77172. Один из отобранных клонов, 2B4, который в последующих тестах показал значительные отличия от клонов дикого типа, содержал делецию в последовательности экзона 7 krt5 после D464, то есть отсутствие мотива VEIATYRKLLEGE.

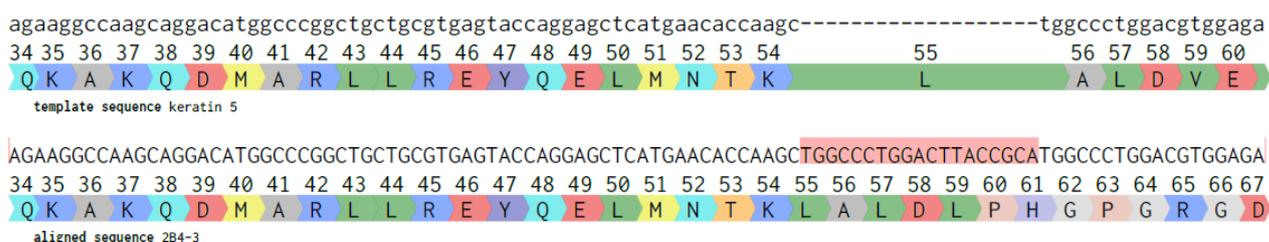


Рисунок 1.2.1a - Пример выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагмента krt5 дикого типа (сверху) с последовательностью ДНК одного из клонов полученной библиотеки мутантов KRT5(снизу). Инсерция выделена розовым цветом, далее продолжается другая рамка считывания

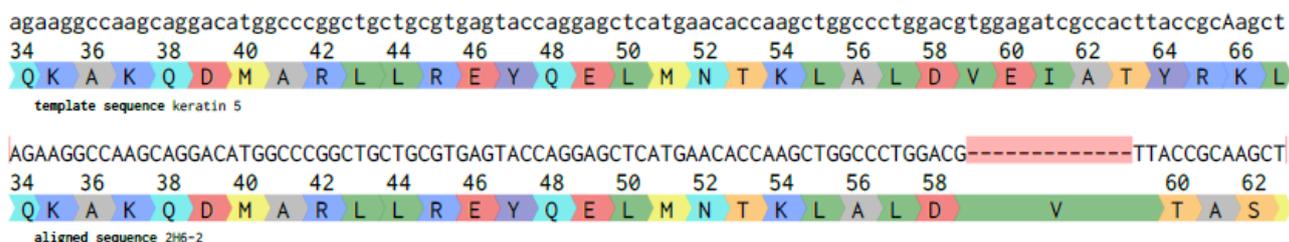


Рисунок 1.2.1б - Пример выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагмента krt5 дикого типа и одного из клонов полученной библиотеки мутантов KRT5. Мутация (делеция трех аминокислот) выделена розовым цветом, далее идет сбой рамки считывания

Таблица 1.1 - Краткая характеристика мутаций, обнаруженных в отдельных клонах НаСаTRT3 после редактирования гена krt5\*

Клон	Библиотека	Мутация(1 аллель)	Мутация (2 аллель)	Мутация (доп.аллель)
2G3	Cas9N	L435C, сдвиг рамки считывания и ПСК (NMD +)	Y470X ПСК (NMD-)	Wild type krt5
1G5	Lenti Cas9	T459A	M446T	R448W
2H6	Cas9N	Del E466-E478(13a o)	Del E466-E478(13 a.o.)	Wild type
2H7	Cas9N	Del A462-R480(19 a.o)	Del A462-R480(19 a.o)	
Нет отдельных клонов		Без сбоя рамки считывания Миссенс мутации		
X	Lenti Cas9	L473 del нет ПСК**		
Клон спецмутагенеза	pC1 Dendra krt5 mut	D197E, K472X (ПСК)		

\*Если при секвенировании клона обнаруживалось 2 варианта последовательности, то предполагалось, что клон гетерозиготен. Более 2-х вариантов последовательности могло происходить из-за наличия смеси клонов или частичной анеуплоидности культуры клеток НаСаТ; ПСК\*\*- предварительный стоп кодон

Для более глубокого анализа спектра мутаций после геномного редактирования, мы применили таргетное высокопроизводительное секвенирование (NGS) на ампликоне фрагмента гена krt5. Результаты представлены на рисунках 1.2.2а и 1.2.2б. Процент мутантных клонов оказался равен 39% для библиотеки клонов, полученных с помощью Cas9, и 35% для библиотеки клонов CAS9nD10A, что соответствует литературным данным об активности данных ферментов. Для обработки результатов NGS использовали недавно опубликованный алгоритм CRISPResso [10, 11]. Программа CRISPResso на данных NGS показала общее количество инсерций и делеций, их размер и распределение. Мы произвели картирование мутаций вдоль последовательности анализируемого ампликона (Рисунок 1.2.2 а). Из рисунков 1.2.2б и 1.2.2в мы видим, что образовавшиеся делеции более продолжительные, чем инсерции, а инсерции локализуются в основном около сайта предполагаемого разрезания Cas9 в районе одной из направляющих РНК.



Рисунок 1.2.2а – Распределение и частота мутаций (делеций, инсерций) в анализируемом ампликоне krt5. Указаны области локализации направляющих РНК.

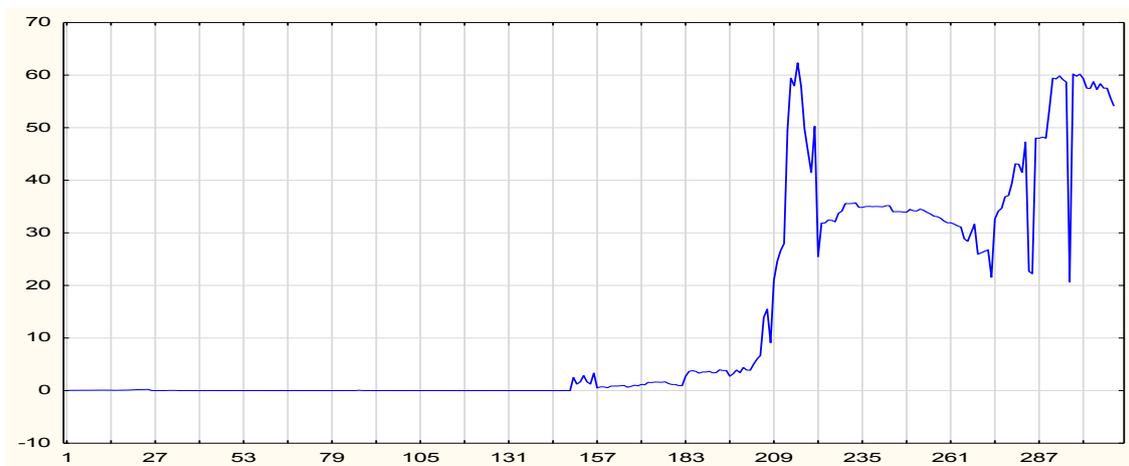


Рисунок 1.2.2б – Распределение делеций, обнаруженных в анализируемом ампликоне. По оси ординат – длина делеций (в нуклеотидах), по оси абсцисс – координаты длины ампликона

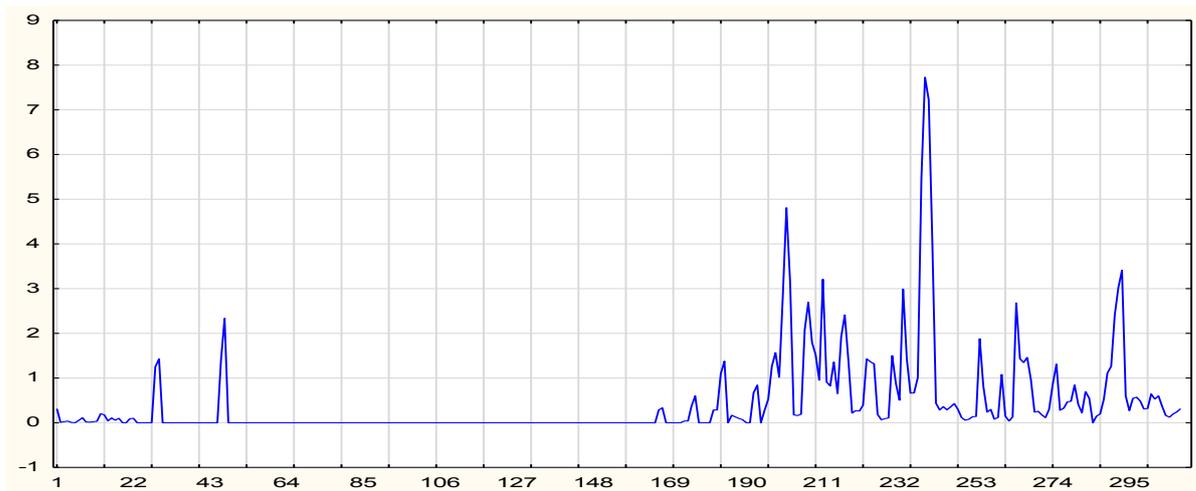


Рисунок 1.2.2в – Распределение инсерций, обнаруженных в анализируемом ампликоне. По оси ординат - длина инсерций (в нуклеотидах)

Мы предположили, что отсутствие высококонсервативных аминокислотных остатков на С конце 2В домена KRT5 приведет к фенотипическим изменениям в структуре цитокератиновой сети мутантных клеток HaCaT. Для первичных культур клеток пациентов с ПБЭ (особенно формы Доулинг-Меара) было показано наличие агрегатов и толстых узлов, возникающих в сети цитокератинов при стрессовых условиях.

Для выявления структур цитокератиновых филаментов в клонах, несущих мутации, мы осуществляли временную трансфекцию мутантных клеток и клеток дикого типа плазмидой, кодирующей KRT14 в одной рамке считывания с кДНК гена красного флуоресцентного белка mCherry. KRT5 и KRT14 образуют строгие гетеродимеры в клетке, поэтому при наблюдении в конфокальном сканирующем режиме мы наблюдали появление узлов и агрегатов цитокератинов в мутантных клетках и нормальную цитокератиновую сеть в случае клеток дикого типа (Рисунок 1.2.3).

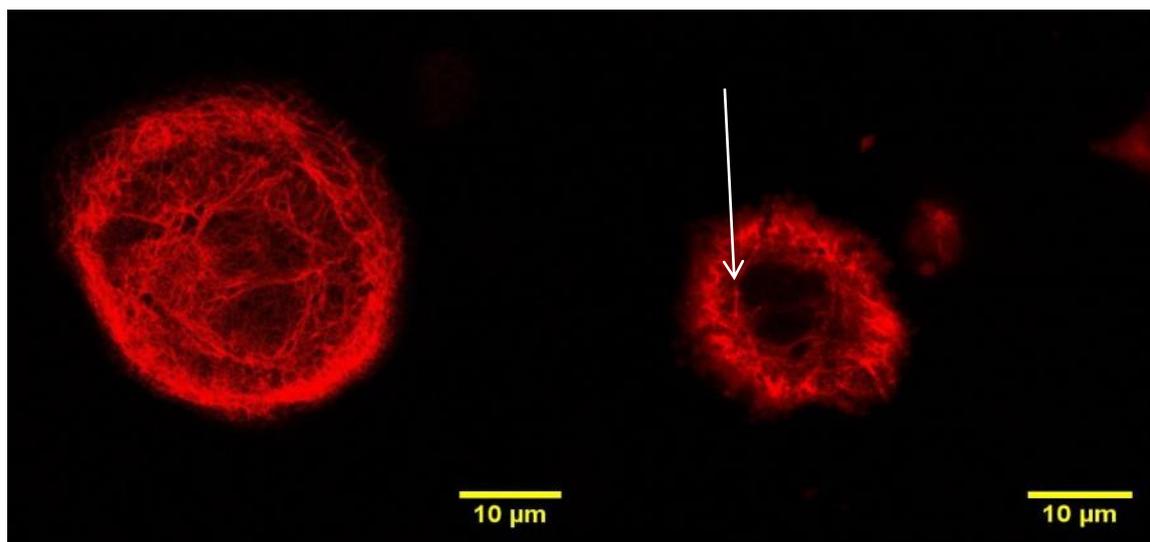


Рисунок 1.2.3 - Микрофотография трансфицированных pmCherrykrt14 HaCaTRT3 дикого типа (слева) и клетки с мутантным KRT5. Получено с помощью сканирующего конфокального микроскопа Zeiss

Изменения и нарушения структуры цитокератиновой сети удается визуализировать, вводя клетку *in vitro* в условия стресса. Это может быть химический стресс или тепловой шок. Как видно из приведенных на рисунках 1.2.4 – 1.2.9 микрофотографий, структура цитокератиновой сети в клетках дикого типа остается практически неизменной при применяемом нами воздействии. Однако полученные нами линии клеток с мутациями в гене *krt5* показывают агрегацию белка цитокератина 5. Чаще всего эти агрегаты можно наблюдать в митотических клетках, что может быть заметно и в клетках, не подвергнутых стрессу. Однако степень агрегации резко увеличивается, особенно при тепловом воздействии, что облегчает идентификацию нарушений и оценку однородности популяции.

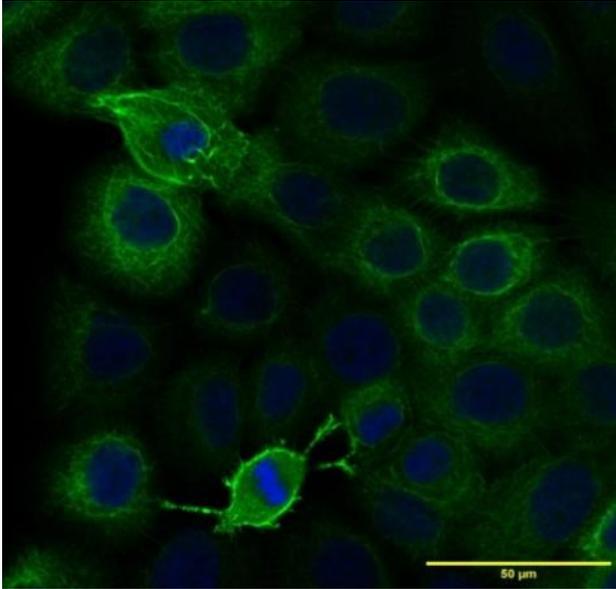


Рисунок 1.2.4 - Культура клеток HaCaT дикого типа. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий).  
Конфокальная микроскопия.

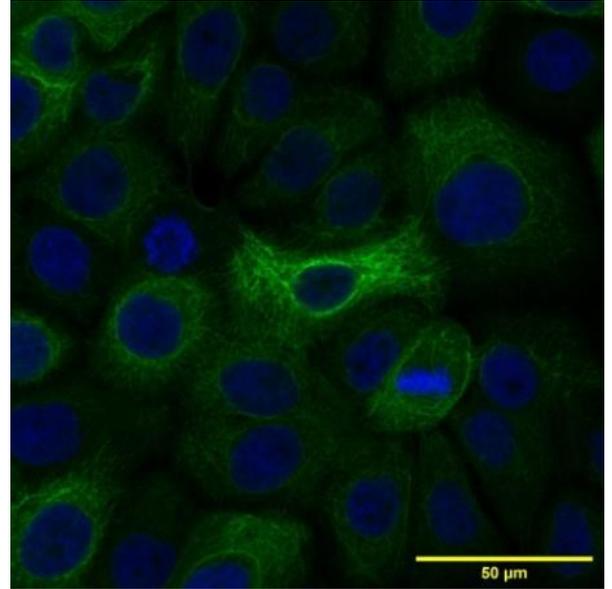


Рисунок. 1.2.5 - Культура клеток HaCaT дикого типа под воздействием осмотического шока. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий).  
Конфокальная микроскопия.

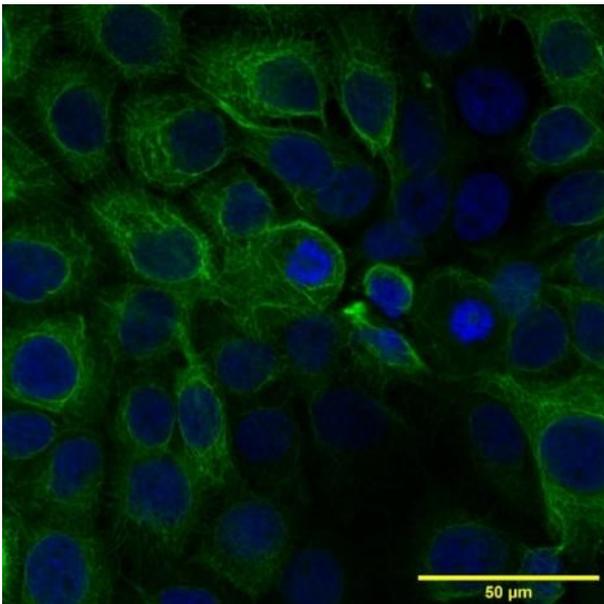


Рисунок 1.2.6 - Культура клеток HaCaT дикого типа под воздействием теплового шока. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий).  
Конфокальная микроскопия.

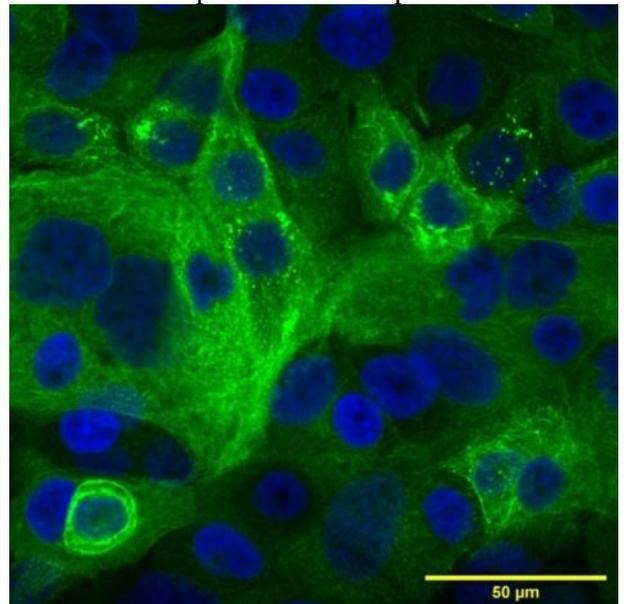


Рисунок 1.2.7 - Культура клеток HaCaT, несущая мутацию в 7 экзоне гена *KRT5*. Клеточная линия была получена путем временной трансфекции плазмидами pSpCas9n(BB)-2A-EGFP и pU6-gRNA. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий). Конфокальная микроскопия.

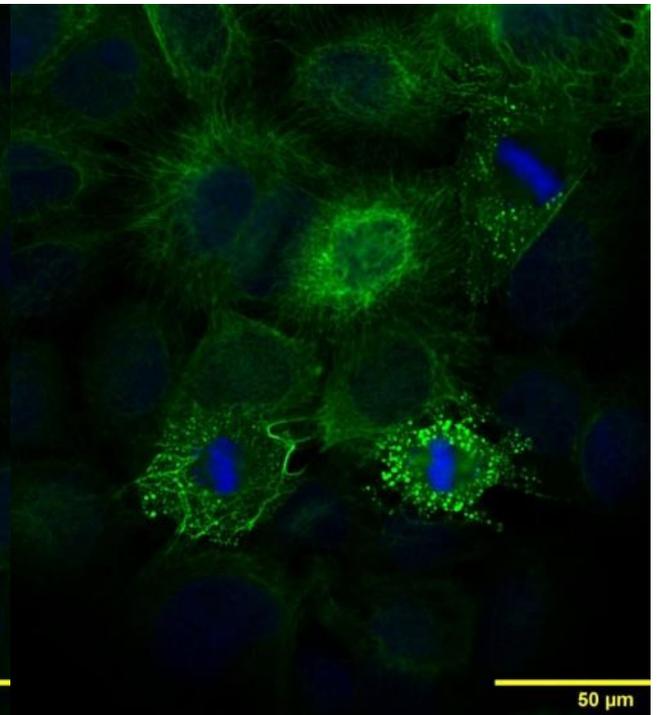
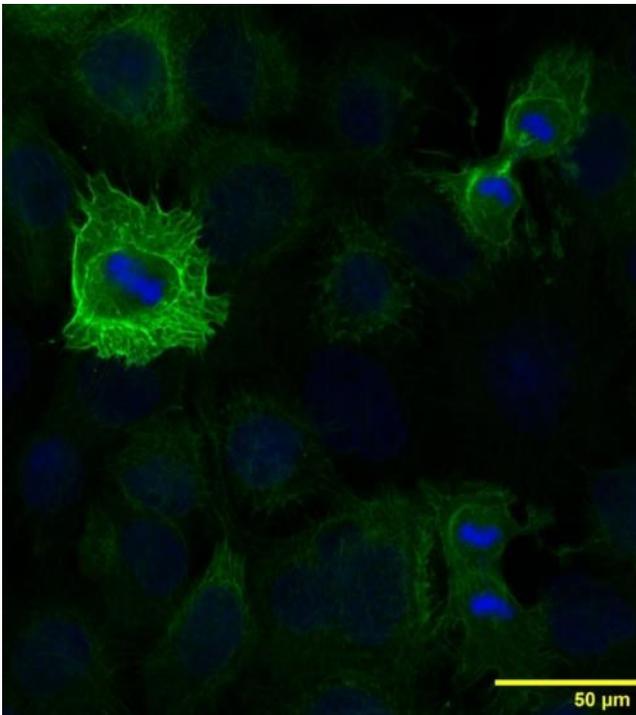
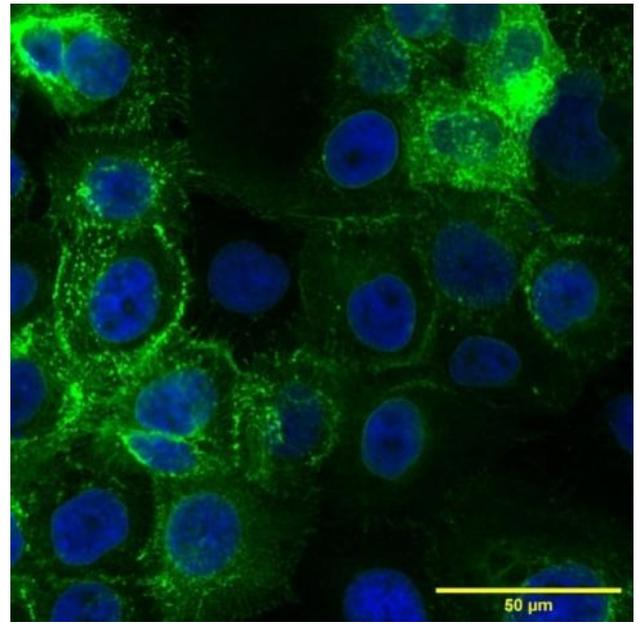
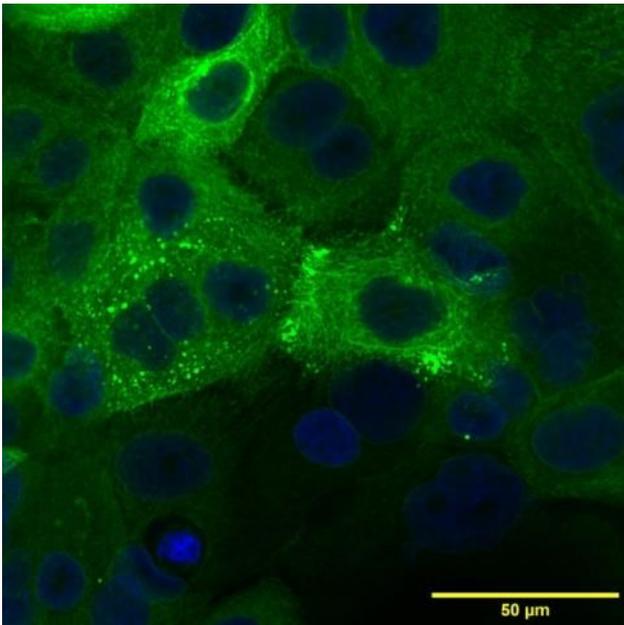


Рисунок 1.2.8 - Культура клеток HaCaT, несущая мутацию в 7 экзоне гена *KRT5*. Клеточная линия была получена путем временной трансдукции лентивирусного вектора, несущего ген Cas9 и sgRNA. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий). Конфокальная микроскопия.

Рисунок 1.2.9 - Культура клеток HaCaT, несущая мутацию в 7 экзоне гена *KRT5*, под воздействием осмотического шока. Клеточная линия была получена путем временной трансдукции лентивирусного вектора, несущего ген Cas9 и sgRNA. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий). Конфокальная микроскопия.

### 1.3 Заключение

1. Разработана клеточная модель простого буллезного эпидермолиза на основе клеточной линии HaCaT путем мутагенеза гена кератина 5 с использованием системы CRISPR/CAS9 [12].
2. Полученные мутантные линии HaCaT показывают четкие фенотипические изменения в структуре сети цитокератинов, что позволяет отличать мутантные клетки от клеток дикого типа.
3. Проявления мутаций могут быть различными в зависимости от их типа и проявляются в виде наличия агрегатов цитокератина 5 либо во всех клетках, либо только в митотических, либо только в части митотических клеток.

## 2 Разработка метода создания живого эквивалента кожи для анализа способности клеток к формированию структур базальной мембраны

Создание и анализ живого эквивалента кожи (ЖЭК) является признанным способом функциональной оценки кератиноцитов. Культивирование кератиноцитов в трехмерной среде позволяет оценить их способность к формированию стратифицированного эпидермиса и базальной мембраны. Кроме этого, ЖЭК является основой для разработки подавляющего числа биомедицинских клеточных продуктов для восстановления эпителио-мезенхимных дефектов тканей, включая кожу [13].

### 2.1 Материалы и методы

В специальные подставки для мультилуночных культуральных плат, позволяющих разделить пространство лунки на два компартмента с помощью полупроницаемой мембраны, заливали коллагеновый гель с заключенными в него фибробластами 3Т3, которые были перед этим обработаны митомицином. На поверхность этого геля высевались НАСАТ, после чего среда в верхней камере убиралась и клетки оставляли расти в течении трех недель в жидкостно-воздушной системе. В конце этого срока ЖЭК фиксировали и получали гистологические срезы методом криотомии. Далее производили окраску срезов гематоксилин-эозином (Рисунок 2.2.1) или иммунофлуоресцентными маркерами (Рисунок 2.2.2).

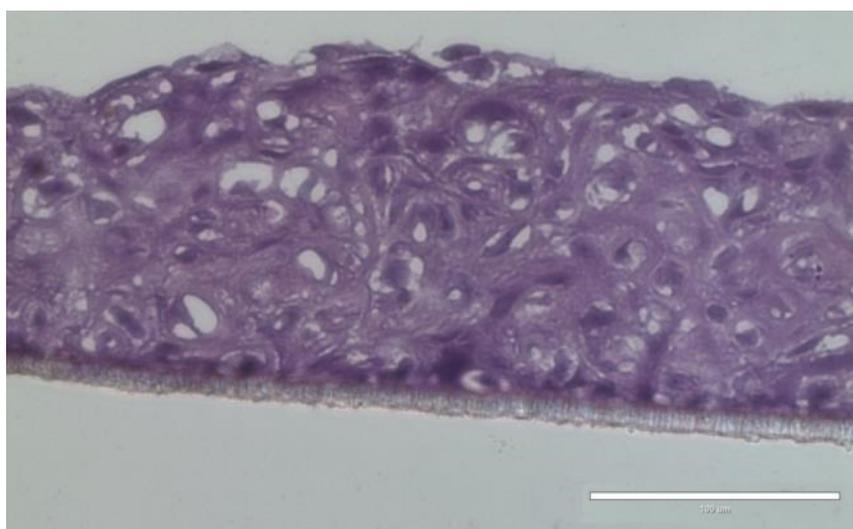


Рисунок 2.2.1- ЖЭК из клеток НаСаТ дикого типа. 3 недели культивирования. Окраска гематоксилин-эозин. Световая микроскопия

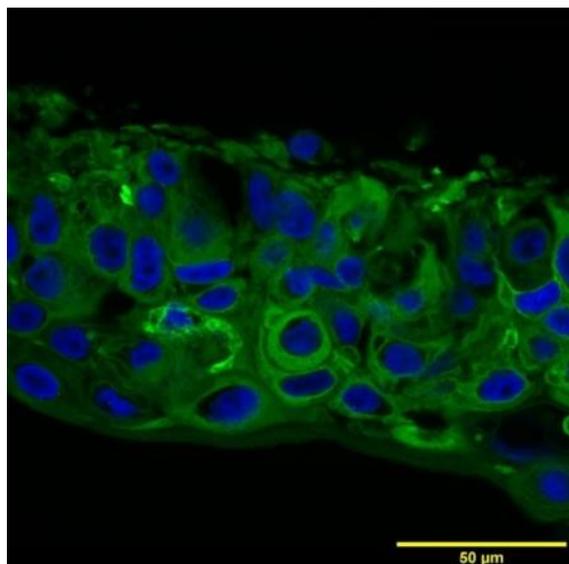


Рисунок – 2.2.2. ЖЭК из клеток NaCaT дикого типа. 3 недели культивирования. Окраска антителами против цитокератина 5 (зеленый) и ядерным красителем Hoechst 33342 (синий). Конфокальная микроскопия.

## 2.2 Результаты и обсуждение

После трех недель культивирования в жидкостно-воздушной системе клетки NaCaT RT3 образуют пласт толщиной в 5-6 слоев клеток. Иммуноцитохимическое окрашивание показывает, что все клетки в пласте положительны по цитокератину 5. Нарушения, происходящие при буллезном эпидермолизе, затрагивают в основном область базальной мембраны. Клетки NaCaTRT3 во многом напоминают клетки базального эпидермиса и формируют базальную мембрану. Однако, её структурное соответствие с нативным эпидермисом в разработанной нами модели ещё необходимо подтвердить.

## 2.3 Заключение

Создан вариант ЖЭК, пригодный для функциональной оценки проявления мутаций в клетках NaCaT.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Has C., Bruckner-Tuderman L. The genetics of skin fragility//Annu. Rev. GenomicsHum. Genet. - 2014. - Vol. 15. P. 245 - 268.
- 2 Fine J.D., Eady R.A., Bauer E.A. et al. The classification of inherited epidermolysisbullosa (EB): report of the third international consensus meeting on diagnosis and classificationof EB//J. Am. Acad. Dermatol. - 2008. - Vol. 58, N 6. P. 931 - 950.
- 3 Uitto J., Bruckner-Tuderman L., Christiano A.M., McGrath J.A., Has C., South A.P.,Kopelan B., Robinson E.C. Progress toward treatment and cure of epidermolysis bullosa:Summary of the DEBRA international research symposium EB2015//J. Invest. Dermatol. - 2016. - Vol. 136, N 2. P. 352 - 358.
- 4 Lee J.Y.W., Liu L., Hsu C.K., Aristodemou S., Ozoemena L., Ogboli M., Moss C.,Martinez A.E., Mellerio J.E., McGrath J.A. Mutations in KLHL24 add to the molecularheterogeneity of epidermolysis bullosa simplex//J. Invest. Dermatol. - 2017. - Vol. 137, N 6. P.1378 - 1380.
- 5 McGrath J.A. Recently identified forms of epidermolysis bullosa//Ann. Dermatol. - 2015. - Vol. 27, P. 658 - 666.
- 6 Cohn H.I., Teng J.M. Advancement in management of epidermolysis bullosa//Curr.Opin. Pediatr. - 2016. - Vol. 28, N 4. P. 507 - 516.
- 7 Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., MaruggiG., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De LucaM. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modifiedepidermal stem cells//Nat. Med. - 2006. - Vol. 12, N 2. P. 1397 - 1402.
- 8 Beilin A.K., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A. Methods of gene therapy for treatment of inherited epidermolysis bullosa//Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология - 2018. - Т. 73, № 4. С. 233 - 241.
- 9 Livingston, R. J., Sybert, V. P., Smith, L. T., Dale, B. A., Presland, R. B., Stephens, K. Expression of a truncated keratin 5 may contribute to severe palmar-plantar hyperkeratosis in epidermolysis bullosa simplex patients//J. Invest. Derm. -2001. - Vol. 116, P. 970 - 974.
- 10 Canver M. et al.// Nature Protocols - 2018. - Vol. 13, N 5. P. 946 - 986.
- 11 Buglak A.A., Telegina T.A., Vorotelyak E.A., Kononov A.I. Theoretical study of photoreactions between oxidized pterins and molecular oxygen // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.12.002>
- 12 Beilin A.K., Andreeva N.V., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A. Development of a Model System for Epidermolysis Bullosa Simplex in HaCaT Cells by Mutagenesis of Keratin 5 with CRISPR/CAS9 Technology//Онтогенез – 2018. - Т. 49, прил. № 4. С. 5 - 6.

13 Kiseleva E.V., Chermnykh E.S., Rogovaya O.S., Batukhtina E.V., Vorotelyak E.A.  
Living skin equivalent as a universal tool for closing full-thickness epithelial-stromal skin,  
urethral and upper respiratory tract injuries//Wound Rep Reg. - 2018. - A8. - DOI:  
10.1111/wrr.12643. WOS:000448193100111

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ 0108-2018-0009 ЗА 2018 ГОД

\*отчетные публикации

1 **Beilin A.K.**, Andreeva N.V., **Gurskaya N.G.**, **Vorotelyak E.A.** Development of a Model System for Epidermolysis Bullosa Simplex in HaCaT Cells by Mutagenesis of Keratin 5 with CRISPR/CAS9 Technology//Онтогенез – 2018. - Т. 49, прил. № 4. С. 5 - 6.

2 \***Beilin A.K.**, **Gurskaya N.G.**, **Vorotelyak E.A.** Methods of gene therapy for treatment of inherited epidermolysis bullosa//Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология - 2018. - Т. 73. № 4. С. 233 - 241.

3. \***Buglak A.A.**, **Telegina T.A.**, **Vorotelyak E.A.**, **Kononov A.I.** Theoretical study of photoreactions between oxidized pterins and molecular oxygen // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.12.002>

4 \***Kiseleva E.V.**, **Chermnykh E.S.**, **Rogovaya O.S.**, **Batukhtina E.V.**, **Vorotelyak E.A.** Living skin equivalent as a universal tool for closing full-thickness epithelial-stromal skin, urethral and upper respiratory tract injuries//Wound Rep Reg. - 2018. - A8. - DOI: 10.1111/wrr.12643. WOS:000448193100111.

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.