

причиной различных мышечных дистрофий, как правило неактивны в указанных выше видах клеток. Тогда для восстановления синтеза белка возможно применение системы активации CRISPR/dCAS9-SAM с отработкой методики по следующему пути: 1) получение клеток из биоптата пациента; 2) активация целевого гена (внесение dCAS9-SAM); 3) коррекция мутации в целевом гене (с помощью технологии CRISPR/Cas9, внесении генотерапевтических конструкций или на уровне РНК с использованием микроРНК, кшРНК и др.); 4) детекция продуктов экспрессии гена. Для клеток НЕК293, не имеющих патогенных мутаций в “мышечных” генах, можно искусственно активировать транскрипцию таких генов и затем применять методы генной инженерии для разработки терапии или изучения развития заболеваний.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрирована концепция создания ТА-клеточных культур. Нами была успешно использована технология CRISPR/dCas9-SAM для создания *in vitro* модели дисферлинопатии с применением нокаутных фибробластов из десны пациентов с мутацией в гене *DYSF* и клеток НЕК293Т\_ТА. В культурах, несущих компоненты SAM, была активирована транскрипция *DYSF* путем внесения специфической sgRNA. В полученных клетках НЕК293Т\_ТА детектировали мРНК гена *DYSF* и белок дисферлин. мРНК гена *DYSF* была обнаружена и в фибробластах после ТА. Далее созданные тест-системы дисферлинопатии будут использованы для оценки эффективности генотерапевтических конструкций и перманентного экзон-скиппинга (пропуска экзонов).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

А. А. Ризванов, В.В. Соловьева, И.Г. Старостина и А.А. Шаймарданова благодарны за поддержку Программой стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (“Приоритет-2030”).

Авторы благодарят В.Л. Зорина и А.И. Зорину за предоставление фибробласты десны

пациента с дисферлинопатией (с гомозиготной мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21)).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1346; ООО “Генотаргет”, Инновационный центр “Сколково”).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г., с поправками, внесенными в 1975 и 1983 гг.). Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом федерального автономного образовательного учреждения высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет” (протокол № 14 от 08.02.2019).

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я., Пулин А.А., Еремин И.И. 2014. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса. Гены и клетки. Т 9. № 4. С. 6. (Deev R.V., Mavlikeev M.O., Bozo I.Ya., Pulin A.A., Eremin I.I. 2014. Gene- and cell-based therapy of muscle system hereditary disorders: state-of-art. Genes Cells V. 9. No. 4. P. 6.)
- Исаев А.А., Бардаков С.Н., Мкртчян Л.А., Мусатова Е.В., Хмелькова Д.Н., Гусева М.В., Каймонов В.С., Яковлев И.А., Деев Р.В. 2023. Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения. Мед. генетика. Т. 22. № 6. С. 3. (Isaev A.A., Bardakov S.N., Mkrtychyan L.A., Musatova E.V., Khmelkova D.N., Guseva M.V., Kaimonov V.S., Yakovlev I.A., Deev R.V. 2023. New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing. Medical Genetics. V. 22. No. 6. P. 3.)

- Старостина И.Г., Соловьева В.В., Шевченко К.Г., Деев Р.В., Исаев А.А., Ризванов А.А. 2012. с. Гены и клетки. Т.7. № 3. С. 25. (*Starostina I.G., Solovyeva V.V., Shevchenko K.G. et al.* 2012. (Formation of the recombinant adenovirus encoding codon-optimized dysferlin gene and analysis of the recombinant protein expression in cell culture *in vitro*. *Cell. Transplantat. Tiss. Eng.* V.7. No. 3. P. 25.)
- Яковлев И.А., Деев Р.В., Соловьева В.В., Ризванов А.А., Исаев А.А. 2016. Пред- и посттранскрипционная модификация генетической информации в программе лечения мышечных дистрофий. Гены и клетки. Т.11. № 2. С. 42. (*Yakovlev I.A., Deev R.V., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A., Isaev A.A.* 2016. Pre- and posttranscriptional genetic information modification in muscular dystrophy treatment. *Genes Cells.* V. 11. No 2. P. 42.)
- Agrawal G. Aung A., Varghese S. 2017. Skeletal muscle-on-a-chip: an in vitro model. V. 17. P. 3447. <https://doi.org/10.1039/c7lc00512a>
- Arab-Bafrani Z., Shahbazi-Gahrouei D., Abbasian M., Fesharaki M. 2016. Multiple MTS assay as the alternative method to determine survival fraction of the irradiated HT-29 colon cancer cells. *J. Med. Signals Sens.* V. 6. P. 112.
- Argov Z., Sadeh M., Mazor K., Soffer D., Kahana E., Eisenberg I., Mitrani-Rosenbaum S., Richard I., Beckmann J., Keers S., Bashir R., Bushby K., Rosenmann H. 2000. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain.* V. 6. P. 1229. <https://doi.org/10.1093/brain/123.6.1229>
- Barthelemy F., Santoso J.W., Rabichow L., Jin R., Little I., Nelson S.F., McCain M.L., Miceli M.C. 2022. Modeling patient-specific muscular dystrophy phenotypes and therapeutic responses in reprogrammed myotubes engineered on micromolded gelatin hydrogels. *Front Cell Dev Biol.* V. 10: 830415. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.830415>
- Belanto J., Diaz-Perez S., Magyar C., Maxwell M., Yilmaz Y., Topp K., Boso G., Jamieson C.H., Cacalano N.A., Jamieson C.A. 2010. Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul Disord.* V. 2. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.12.003>
- Bouchard C., Tremblay J.P. 2023. Portrait of dysferlinopathy: diagnosis and development of therapy. *J. Clin. Med.* V. 12: 6011. <https://doi.org/10.3390/jcm12186011>
- Bruge C., Geoffroy M., Benabides M., Pellier E., Gicquel E., Dhiab J., Hoch L., Richard I., Nissan X. 2022. Skeletal muscle cells derived from induced pluripotent stem cells: a platform for limb girdle muscular dystrophies. *Biomed.* V. 10: 1428. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061428>
- Chamberlain J.R., Chamberlain J.S. 2017. Progress toward gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* V. 5. P. 1125. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.019>
- Crisafulli S., Sultana J., Fontana A., Salvo F., Messina S., Trifiro G. 2020. Global epidemiology of duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J. Rare Dis.* V. 15. P. 141. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>
- Defour A., Van der Meulen J.H., Bhat R., Bigot A., Bashir R., Nagaraju K., Jaiswal J.K. 2014. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death Dis.* V. 5: 1306. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.272>
- Heidersbach A.J., Dorighi K.M., Gome J.A. 2023. A versatile, high-efficiency platform for CRISPR-based gene activation. *Nat. Commun.* V. 14. P. 902. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36452-w>
- Hunt C., Hartford S.A., White D., Pefanis E., Hanna T., Herman C., Wiley J., Brown H., Su Q., Xin Y., Voronin D., Nguyen H., Altarejos J., Crosby K., Haines J. et al. 2021. Tissue-specific activation of gene expression by the Synergistic Activation Mediator (SAM) CRISPRa system in mice. *Nat. Commun.* V. 12. P. 2770. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22932-4>
- Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Tanaka H., Vereshchagin N.V., Markova E.D., Poleshchuk V.V., Lozhnikova S.M., Sukhorukov V.S., Limborska S.A., Slominsky P.A., Bulayeva K.B., Tsuji S. 1996. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain.* V. 6. P. 1895. <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.1895>
- Jean J., Lapointe M., Soucy J., Pouliot R. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J. Dermatol. Sci.* V. 53. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.07.009>
- Jiang J., Sun Y., Xiao R., Wai K., Ahmad M.J., Khan F.A., Zhou H., Li Z., Zhang Y., Zhou A., Zhang S. 2019. Porcine antiviral activity is increased by CRISPRa-SAM system. *Biosci. Rep.* V. 8. <https://doi.org/10.1042/BSR20191496>
- Jensen T.I., Mikkelsen N.S., Gao Z, Føjbelteder J., Pabst G., Axelgaard E., Laustsen A., König S., Reinisch A., Bak R.O. 2021. Targeted regulation of transcription in primary cells using CRISPRa and CRISPRi. *Genome Res.* V. 3111. P. 2120. <https://doi.org/10.1101/gr.275607.121>
- Johnson C.I., Argyle D.J., Clements D.N. 2016. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet. J.* V. 209. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011>
- Kabadi A.M., Thakore P.I., Vockley C.M., Ousterout D.G., Gibson T.M., Guilak F., Reddy T.E., Gersbach C.A.

2015. Enhanced MyoD-induced transdifferentiation to a myogenic lineage by fusion to a potent transactivation domain. *ACS Synth. Biol.* V. 6. P. 689.  
<https://doi.org/10.1021/sb500322u>
- Katt M.E., Placone A.L., Wong A.D., Xu Z.S., Searson P.C.* 2016. *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 4. P. 12.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Khaiboullina S.F., Martynova E.V., Bardakov S.N., Mavlikeev M.O., Yakovlev I.A., Isaev A.A., Deev R.V., Rizvanov A.A.* 2017. Serum cytokine profile in a patient diagnosed with dysferlinopathy. *Case Rep. Med.* V. 2017: 3615354.  
<https://doi.org/10.1155/2017/3615354>
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F.* 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* V. 523. P. 583.  
<https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Lek A., Evesson F. J., Sutton R. B., North K. N., Cooper S.T.* 2012. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic.* V. 13. P. 185.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>
- Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L., Cohen S., Tzofi Z., Cohen Y., Wirguin Y., Dabby R., Lev D., Sadeh M.* 2007. Dysferlinopathy in the jews of the caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromus. Disord.* V. 17. P. 950.  
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.07.010>
- Liu W., Pajusalu S., Lake N.J., Zhou G., Ioannidis N., Mittal P., Johnson N.E., Wehl C.C., Williams B.A., Albrecht D.E., Rufibach L.E., Lek M.* 2019. Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases. *Genet. Med.* V. 21. P. 2512.  
<https://doi.org/10.1038/s41436-019-0544-8>
- Luo N., Zhong W., Li J., Zhai Z., Lu J., Dong R.* 2022. Targeted activation of HNF4 $\alpha$ /HGF1/FOXA2 reverses hepatic fibrosis via exosome-mediated delivery of CRISPR/dCas9-SAM system. *Nanomed.* V. 17. P. 1411.  
<https://doi.org/10.1021/nnm-2022-0083>
- Mamchaoui K., Trollet C., Bigot A., Negroni E., Chaouch S., Wolff A., Kandalla P.K., Marie S., Di Santo J., St. Guily J.L., Muntoni F., Kim J., Philippi S., Spuler S., Levy N., et al.* 2011. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle.* V. 1. P. 34.  
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-34>
- Rossi R., Torelli S., Ala P., Weston W., Morgan J., Malhotra J., Muntoni F.* 2023. MyoD-induced reprogramming of human fibroblasts and urinary stem cells in vitro: protocols and their applications. *Front. Physiol.* V. 14: 1145047.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1145047>
- Salmon P., Trono D.* 2006. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.* V. 4. U. 4.21.  
<https://doi.org/10.0.3.234/0471142301.ns0421s53>
- Salari N., Fatahi B., Valipour E., Kazeminia M., Fatahian R., Kiaei A., Shohaimi S., Mohammadi M.* 2022. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *J. Orthop Surg. Res.* V. 17. P. 96.  
<https://doi.org/10.1186/s13018-022-02996-8>
- Shin M.K., Bang J.S., Lee J.E., Tran H.D., Park G., Lee D.R., Jo J.* 2022. Generation of skeletal muscle organoids from human pluripotent stem cells to model myogenesis and muscle regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. N. 5108.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23095108>
- Stoppelkamp S., Bell H.S., Palacios-Filardo J., Shewan D.A., Riedel G., Platt B.* 2011. *In vitro* modelling of Alzheimer's disease: degeneration and cell death induced by viral delivery of amyloid and Tau. *Exp Neurol.* V. 229. P. 226.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.018>
- Stewart S.A., Dykxhoorn D.M., Palliser D., Mizuno H., Yu E.Y., An D.S., Sabatini D.M., Chen I.S., Hahn W.C., Sharp P.A., Weinberg R.A., Novina C.D.* 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA.* V. 4. P. 493.  
<https://doi.org/10.1261/rna.2192803>
- Szulc J., Wiznerowicz M., Sauvain M.O., Trono D., Aebischer P.* 2006. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods.* V. 3. P. 10.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth846>
- Thomas P., Smart T.G.* 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* V. 51. P. 187.  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Tominaga K., Tominaga N., Williams E.O., Rufibach L., Schöwel V., Spuler S., Viswanathan M., Guarente L.P.* 2021. 4-Phenylbutyrate restores localization and membrane repair to human dysferlin mutations. *iScience.* V. 25. N. 103667.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103667>
- Tumiati L.C., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Williams W.G., Li R.K.* 1994. An *in vitro* model to study myocardial ischemic injury. *J. Tiss. Culture Methods.* V. 16. P. 1.  
<https://doi.org/10.1007/BF01404830>
- Ulman A., Kot M., Skrzypek K., Szweczyk B., Majka M.* 2021. Myogenic differentiation of ips cells shows different efficiency in simultaneous comparison of protocols. *Cells.* V. 10. P. 1671.  
<https://doi.org/10.3390/cells10071671>
- Umakhanova Z.R., Bardakov S.N., Mavlikeev M.O., Chernova O.N., Magomedova R.M., Akhmedova P.G.,*

- Yakovlev I.A., Dalgatov G.D., Fedotov V.P., Isaev A.A., Deev R.V.* 2017. Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. *Front. Neurol.* V. 8. P. 77.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00077>
- Urtizberea J.A., Bassez G., Leturcq F., Nguyen K., Krahn M., Levy N.* 2008. Dysferlinopathies. *Neurol. India.* V. 3. P. 289.  
<https://doi.org/10.4103/0028-3886.43447>
- Vunjak Novakovic G., Eschenhagen T., Mummery C.* 2014. Myocardial tissue engineering: *in vitro* models. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* V. 4: a014076.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014076>
- Wang H., La Russa M., Qi L.S.* 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* V. 85. P. 227.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang C.H., Lundh M., Fu A., Kriszt R., Huang T.L., Lynes M.D., Leiria L.O., Shamsi F., Darcy J., Greenwood B.P., Narain N.R., Tolstikov V., Smith K.L., Emanuelli B., Chang Y.T., et al.* 2020. CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci. Transl. Med.* V. 26: eaaz8664.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz8664>
- Xiong K., Zhou Y., Hyttel P., Bolund L., Freude K.K., Luo Y.* 2016. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) stably expressing CRISPR-based synergistic activation mediator (SAM). *Stem Cell Res.* V. 17. P. 665.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.10.011>
- Zhang Y.S., Oklu R., Albadawi H.* 2017. Bioengineered *in vitro* models of thrombosis: methods and techniques. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* V. 7. P. 329.  
<https://doi.org/10.21037/cdt.2017.08.08>
- Zorin V.L., Pulin A.A., Eremin I.I., Korsakov I.N., Zorina A.I., Khromova N.V., Sokova O.I., Kotenko K.V., Kopnin P.B.* 2017. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells. *Cell Cycle.* V. 16. P. 545.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1284714>

## DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* MODEL OF DYSFERLINOPATHY VIA CRISPR/CAS-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF THE *DYSF* GENE

I. A. Yakovlev<sup>a, b, \*</sup>, Y. S. Slesarenko<sup>b</sup>, I. G. Starostina<sup>c</sup>, A. A. Shaimardanova<sup>c</sup>,  
 V. V. Solovyova<sup>c</sup>, P. A. Bobrovsky<sup>d</sup>, E. N. Grafkaia<sup>d</sup>, L. D. Belikova<sup>d</sup>, S. N. Bardakov<sup>a</sup>,  
 A. A. Rizvanov<sup>c, f</sup>, A. A. Isaev<sup>a</sup>, R. V. Deev<sup>a, b, e</sup>

<sup>a</sup>Artgene Biotech, Moscow, 119333, Russia

<sup>b</sup>OOO Genotarget, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

<sup>c</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia

<sup>d</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russia

<sup>e</sup>Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow 117418, Russia

<sup>f</sup>Division of Medical and Biological Sciences, Tatarstan Academy of Sciences, Kazan, 420111, Russia

\*E-mail: mail@genotarget.com

Scientists need cell models from human tissues to develop methods of gene therapy and genome editing for monogenic diseases. It is preferable to use minimally invasive methods to obtain samples; these tissues can be applied for further screening in order to select the most effective approach to restore the synthesis of the target protein. We used the CRISPR/Cas9-SAM transcriptional activation system, which ensures expression of the *DYSF* gene in HEK293T cells, as well as in fibroblasts from patients with dysferlinopathy (c.2779delG (Ala927LeufsX21)). After targeted activation of *DYSF*, it was possible to detect the main gene products: mRNA and protein (HEK293T\_TA) and mRNA (fibroblasts). Transcriptionally activated dysferlin-deficient fibroblasts and HEK293 cells can be used to evaluate the *in vitro* efficacy of gene therapy for dysferlinopathies.

**Keywords:** muscular dystrophy, dysferlinopathy, dysferlin, genome editing, transcriptional activation, disease models, CRISPR/Cas9, fibroblasts