

УДК 576.08:575.164

РАЗРАБОТКА *IN VITRO* МОДЕЛИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ ПОСРЕДСТВОМ CRISPR/CAS-ОПОСРЕДОВАННОЙ АКТИВАЦИИ ГЕНА *DYSF*

© 2024 г. И. А. Яковлев^{1, 2, *}, Я. С. Слесаренко², И. Г. Старостина³,
А. А. Шаймарданова³, В. В. Соловьева³, П. А. Бобровский⁴, Е. Н. Графская⁴, Л. Д. Беликова⁴,
С. Н. Бардаков¹, А. А. Ризванов^{3, 6}, А. А. Исаев¹, Р. В. Деев^{1, 2, 5}

¹ ПАО “Артген биотех”, Москва, 119333, Россия

² ООО “Генотаргет”, Инновационный центр “Сколково”, Москва, 121614, Россия

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, 119435, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына, Москва, 117418, Россия

⁶ Отделение медицинских и биологических наук, АН Республики Татарстан, Казань, 420111, Россия

* E-mail: mail@genotarget.com

Поступила в редакцию 11.10.2023

После доработки 15.05.2024

Принята к публикации 21.05.2024

Для разработки методов генной терапии и геномного редактирования при моногенных заболеваниях необходимы клеточные модели из тканей человека, полученных малоинвазивными методами, позволяющие провести скрининг и выбрать наиболее эффективный подход по восстановлению синтеза целевого белка. В работе применена система транскрипционной активации CRISPR/dCas9-SAM, обеспечивающая экспрессию гена *DYSF* в клетках линии НЕК293Т, а также в фибробластах десны пациента с дисферлинопатией (с гомозиготной мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21)). После активации гена *DYSF* удалось детектировать его функциональные продукты (мРНК гена и белок) в транскрипционно активированных (ТА) клетках НЕК293Т (НЕК293Т_ТА) и мРНК в фибробластах. Активация транскрипции интересующего гена в фибробластах и клеточной линии НЕК293Т_ТА может быть использована для *in vitro* оценки эффективности геномного редактирования и генной терапии дисферлинопатии. Активируя ген, участвующий в развитии той или иной патологии, можно впоследствии использовать системы редактирования генома, а также конструкции для генной терапии. Это позволит более точно изучать вклад различных мутаций в патогенез заболевания и разрабатывать этиотропное лечение.

Ключевые слова: миодистрофии, дисферлинопатия, дисферлин, геномное редактирование, транскрипционная активация, модели заболеваний, CRISPR/dCas9, фибробласты

Принятые сокращения: ТА – транскрипционная активация; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ); ПКМД – пояснично-конечностная мышечная дистрофия

DOI: 10.31857/S0041377124040064 EDN: QCPXOW

Мышечные дистрофии являются первичным поражением мышечной ткани, которое развивается непрерывно-прогрессирующе, приводя к инвалидности в трудоспособном возрасте, а при некоторых нозологических формах и к смерти в детском и подростковом возрастах. Общая распространенность мышечных дистрофий составляет 4:100 000 (Salari et al., 2022), наиболее часто встречающиеся – миодистрофия Дюшенна (3:100 000 общего населе-

ния и 20:100 000 живых новорожденных мальчиков) (Crisafulli et al., 2020) и группа пояснично-конечностных мышечных дистрофий (от 1:14500 до 1:123 000) (Umakhanova et al., 2017; Liu et al., 2019). Миодистрофии вызваны мутациями в генах, кодирующих белки, вовлеченные в гистогенез и функционирование скелетной мышечной ткани. Этиотропного лечения этих заболеваний не существует (Деев и др., 2014).

Дисферлин относится к подгруппе ферлинов семейства белков, состоящих из Ca^{2+} -чувствительных доменов C2, которые участвуют в слипании везикул, транспортировке и восстановлении мембран (Lek et al., 2012). Мутации в гене *DYSF* способствуют развитию нескольких типов мышечных дистрофий: дистальной миопатии, пояснично-конечностной мышечной дистрофии R2 (ПКМД R2) и миопатии Миоши. Это дегенеративные заболевания скелетных мышц, которые обычно появляются в подростковом возрасте и в конечном итоге приводят к потере мышечной массы и мобильности (Bouchard et al., 2023).

Аутосомно-рецессивная мутация c.2779delG связана с делецией гуанина в позиции 927 экзона 26 в гене *DYSF*. Это вызывает сдвиг рамки считывания и образуется преждевременный стоп-кодон (p.Ala927LeufsX21). В результате синтезируется либо нефункциональный белок, либо происходит нонсенс-опосредованный распад мРНК (Leshinsky-Silver et al., 2007; Khaiboullina et al., 2017; Исаев и др., 2023).

В настоящее время этиотропного лечения ПКМД R2 не существует. В качестве наиболее оптимального терапевтического подхода миодистрофий научное сообщество рассматривает методы генной терапии, позволяющие вносить изменения в генетический материал клетки (ДНК или РНК) (Яковлев и др., 2016; Chamberlain et al., 2017). Для разработки и оценки работоспособности такой стратегии необходимы модели *in vitro*, с помощью которых можно провести скрининг технологий (редактирования ДНК, РНК, доставки терапевтических молекул различными векторами) и выбрать наиболее точные и эффективные возможности для восстановления синтеза целевого белка. Для этого используют линии НЕК293, HeLa, Caco-2 и другие. Такие модели обладают рядом характеристик, важных для исследований: простота культивирования, быстрая скорость деления, высокая эффективность трансфекции и продукции белка (Thomas et al., 2005).

Однако этого недостаточно для детальной проверки генетических конструкций. Чтобы иметь полное представление о возможностях терапевтических агентов, направленно воздействующих на конкретные участки ДНК или РНК, исследователи работают с пациент-специфичными клетками. Для исследований

в области наследственных заболеваний мышечной ткани могут применяться:

- миобласты от здоровых доноров и пациентов с дисферлинопатией (Mamchaoui et al., 2011);
- индуцированные плюрипотентные стволовые клетки с последующей миогенной дифференцировкой (Ulman et al., 2021; Bruge et al., 2022);
- искусственные миобласты, полученные в результате лентивирусной трансдукции MyoD фибробластов (Kabadi et al., 2015; Rossi et al., 2023);
- клетки, в которых с помощью системы CRISPR/dCas9-SAM активирована транскрипция интересующего гена (Jiang et al., 2019; Heidersbach et al., 2023; Jensen et al., 2021).

В связи с низкой распространенностью орфанных заболеваний и, в частности, миодистрофий, а также многообразием мутаций и форм заболеваний (Illarioshkin et al., 1996; Argov et al., 2000; Urtizberea et al., 2008), забор биоптата для выделения первичных миобластов в условиях лаборатории зачастую весьма затруднителен. Для решения проблемы получения биоматериала мы создали клеточную тест-систему (модель заболевания) из имеющихся клеточных линий с помощью TA-системы CRISPR/dCas9-SAM (версии CRISPR/Cas9 технологии с инактивированным нуклеазным доменом Cas9) и дополнительными компонентами активации SAM (synergistic activation mediator). С помощью направляющей РНК (sgRNA) SAM целенаправленно рекрутирует комбинации белков MS2-P65-HSF1 к области целевого промотора и за счет этого включает транскрипцию интересующего гена (рис. 1) (Hunt et al., 2021).

CRISPR/dCas9-SAM состоит из: 1) гибрида инактивированной нуклеазы dCas9 и белка VP64, 2) гидовой РНК (sgRNA) с двумя РНК-аптамерами MS2 и 3) вспомогательного белка активации MS2-P65-HSF1. Доставка комплекса осуществляется трансдукцией трех отдельных лентивирусных частиц, содержащих каждый из компонентов. Внутри клетки комплекс из sgRNA-MS2 и dCas9-VP64 рекрутирует комбинацию белков MS2-P65-HSF1 к области целевого промотора и таким образом обеспечивает его активацию и начало трансляции белка (Konermann et al., 2015).

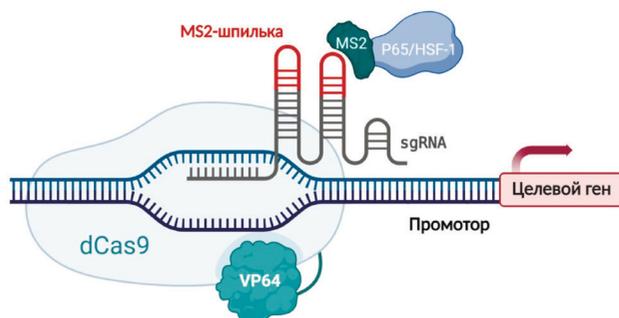


Рис. 1. Система транскрипционной активации CRISPR/Cas9-SAM.

В качестве клеточной модели для включения транскрипции гена мы выбрали линию HEK293T, в которой, согласно данным (The human protein atlas; <https://www.proteinatlas.org>), эндогенный дисферлин не обнаруживается, исследуемый белок не продуцируется, и его детекция возможна только после активации, что подтверждено различными исследованиями (Старостина и др., 2012; Tominaga et al., 2021). Мы также использовали фибробласты пациента с дисферлинопатией [с.2779delG (Ala927LeufsX21)] (далее – DYSF-нокаутные фиброласты) (Khaiboullina et al., 2017; Исаев и др., 2023).

Цель работы заключалась в получении транскрипционно активированных (ТА) клеток HEK293T (HEK293T_TA) и мутантных фибробластов из десны пациента с последующим их использованием в качестве *in vitro* модели для генной терапии. В работе мы успешно применили систему CRISPR/dCas9-SAM и обеспечили включение гена *DYSF*. В полученных клетках HEK293T_TA детектировали мРНК гена *DYSF* и белок дисферлин; мРНК *DYSF* также была обнаружена в фибробластах после ТА. Это дает нам возможность использовать их для более глубокой оценки эффективности терапевтических конструкций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и их культивирование. Фибробласты десны пациента с мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21) в 26-м экзоне гена дисферлина были выделены из биоптата экплантационным методом по стандартному протоколу (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8071911/>). Биоптаты десны пациента были получены в ходе операции, с предварительным получением

информированного согласия пациента (Zorin et al., 2017).

В работе использовали клеточные линии HEK293T (ATCC, США), C2C12 (ATCC, США) и миобласты человека без дисферлинопатии (получены из ЦКП “Биобанк” Медико-генетического научного центра им. академика Н.П. Бочкова, Москва). Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей фетальную бычью сыворотку (FBS; Gibco, США) в количестве 10% (фибробласты), 5% (HEK293T) или 15% (миообласты), 1мМ глутамина (“ПанЭко”, Россия), 50 ед./мл пенициллин–стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) в пластиковых культуральных чашках без дополнительного покрытия в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 37° С и влажности 80%. Среду меняли каждые 72 ч. Как только клетки достигали желаемой конfluence, их промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS; “ПанЭко”, Россия), а затем пассировали с использованием 0.25%-ного раствора трипсина (“ПанЭко”, Россия). Клетки инкубировали в течение 5 минут для нарушения межклеточных контактов и отделения от культурального пластика. После этого инактивировали трипсин эквивалентным объемом среды. Клетки собирали, промывая культуральную чашку потоком среды, переносили в пробирку емкостью 15 мл и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в культуральной среде. Затем необходимое количество клеточной суспензии высевали на культуральный пластик.

Для криоконсервации клетки, снятые с чашки, ресуспендировали в FBS и переносили в криопробирку. К суспензии по каплям добавляли равный объем смеси FBS и 20% ДМСО (“ПанЭко”, Россия) и замораживали при –70° С. На следующий день замороженные клетки переносили в жидкий азот для длительного хранения.

Проточная цитометрия. Антигенные свойства фибробластов человека анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Aria III (BD Bioscience, США) согласно инструкции производителя (BD Bioscience, США) с использованием набора антител Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD Bioscience, США) к CD73, CD90, CD105 и коктейль антител к CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-

DR, контроли для проведения компенсации и изотипические контроли.

Охарактеризованные клетки были иммортализованы посредством нокаута гена *p53*. Нокаут осуществляли трансдукцией лентивируса, собранного с помощью плазмиды pLVUHshp53 (#11653; Addgene plasmid, Patrick Aebischer, <http://n2t.net/addgene:11653>; RRID:Addgene_11653), содержащей зеленый флуоресцирующий белок (gfp) (Szulc et al., 2006). Для получения чистой популяции клеток, несущих LVUHshp53-gfp, клетки сортировали с помощью проточного цитофлуориметра-сортера BD FACS Aria III (BD Bioscience, США).

Вестерн-блот-анализ. Электрофорез проводили по методу Лэммли с использованием 6%-ного концентрирующего и 10%-ного разделяющего полиакриламидных гелей. Разделение белков осуществляли при силе тока 30 мА на один гель в трис-глициновом электродном буфере (BioRad, США). Электрофорез останавливали после достижения фронтом бромфенолового синего конца геля.

Далее проводили электроперенос белков из полиакриламидного геля на PVDF-мембрану (BioRad, США), предварительно активированную 96%-ным этанолом в течение 1 мин при силе тока 0.8 мА/см² с использованием прибора для полусухого переноса TE77XP (Serva, Германия). PVDF-мембраны инкубировали в блокирующем буфере с первичными поликлональными антителами к белку *p53* (ab131442; Abcam, Великобритания; разведение 1:200) в течение ночи при 4°С. Для приготовления отмывочного раствора использовали PBS, содержащий 0.1% Tween 20 (Sigma, США). Отмывку от несвязавшихся первичных антител проводили 3 раза в течение 10 минут при комнатной температуре и перемешивании на шейкере. Затем мембраны инкубировали при комнатной температуре в течение часа со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab154; Sigma, США; разведение 1:2000).

Для оценки наработки белка DYSF использовали первичные поликлональные антитела к дисферлину в блокирующем буфере (ab15108; Abcam, Великобритания; разведение 1:200) и вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab154; Sigma, США; разведение 1:2000). Для

нормализации данных использовали β-актин (8227; Abcam, Великобритания).

Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью хромогенного субстрата Peroxidase substrate solution (Vector Laboratories, США). Реакцию останавливали отмывкой PVDF-мембраны в дистиллированной воде. Мембраны высушивали на фильтровальной бумаге, оцифровывали на сканере ChemiDoc (BioRad, США). Денситометрию осуществляли с помощью стандартной программы ImageJ.

Сборка лентивирусных конструкций. В ходе работы использовали плазмидные конструкции: оболочечную плазмиду для лентивирусов pCMV-VSV-G (Lab. Bob Weinberg; #8454, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:8454>; RRID:Addgene_8454) (Stewart et al., 2003), упаковочную лентивирусную плазмиду psPAX2 (Lab. Didier Trono, #12260, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene_12260), векторные плазмиды lenti MS2-P65-HSF1_Hygro (Feng Zhang; #61426, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61426>; RRID:Addgene_61426), lenti dCAS-VP64_Blast (Feng Zhang, #61425A, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61425>; RRID:Addgene_61425), lenti sgRNA(MS2)_zeo backbone (gRNA_1, gRNA_4) (Feng Zhang, #61427, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61427>; RRID:Addgene_61427) (Konermann et al., 2015), pLVUHshp53 (Patrick Aebischer & Didier Trono, #11653, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:11653>; RRID:Addgene_11653) (Szulc et al., 2006). Для получения рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса проводили котрансфекцию пакующей клеточной линии HEK293A тремя плазмидами (оболочечной, упаковочной и векторной), согласно стандартному протоколу (Salmon et al., 2006).

Оптимизация концентраций антибиотиков. Для определения концентрации антибиотиков максимального ингибирования клеток (IC100) проводили MTS-тест по стандартному протоколу (Arab-Bafrani et al., 2016). Количество жизнеспособных клеток оценивали путем измерения флуоресценции образовавшегося формазана (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega, США) на микропланшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd., Швейцария) при длине волны 490 нм. MTS-тест проводили в соответствии

с инструкцией производителя (Promega™ CellTiter 96™ AQueous one solution cell proliferation assay, США). Для селекции использовали антибиотики бластицидин (10 мг/мл; Invivogen, США), гигромицин (50 мг/мл; Invivogen, США), зеоцин (100 мг/мл; Invivogen, США). Для выбора концентрации, при которой происходит гибель всех клеток использовали разведения, согласно протоколам производителя: бластицидин: 2–15 мкг/мл, гигромицин: 50–250 мкг/мл, зеоцин: 100–500 мкг/мл. Замену среды с антибиотиком производили каждые 3–4 сут. После этого выбирали концентрацию, при которой происходит гибель клеток в течение 1–2 нед.

Транскрипционная активация. ТА-система CRISPR/dCas9-SAM состоит из гибрида инактивированной нуклеазы dCas9 и белка VP64, гидовой РНК (sgRNA) с двумя РНК-аптамерами MS2 и вспомогательного белка активации MS2-P65-HSF1. Доставка комплекса осуществлена трансдукцией трех отдельных лентивирусных частиц, содержащих каждый из компонентов. Внутри клетки комплекс sgRNA–MS2 и dCas9–VP64 рекрутирует комбинацию белков MS2–P65–HSF1 к области целевого промотора и таким образом обеспечивают его включение и начало трансляции целевого белка (Konermann et al., 2015).

Для специфичной работы системы была использована коммерчески доступная гидовая РНК, нацеленная на первые 200 п.н. выше сайта начала транскрипции (TSS) гена *DYSF* (GenScript, США). Итоговая последовательность sgRNA1 (CGCCGCGGGCAGGGCGGATC) клонирована в gRNA-экспрессионный вектор pLenti_sgRNA(MS2)_зо.

Фибробласты с мутацией в 26-м экзоне гена *DYSF*, нокаутные по гену *p53* (HF-mut26-p53) и фибробласты с мутацией в 26 экзоне гена *DYSF* без нокаута гена *p53* (HF-mut26) рассеивали в 6-луночный культуральный планшет по 30 000 клеток на 1 лунку. Смешивали 250 мкл концентрированного вируса (множественность заражения –5 MOI/кл.) с 750 мкл среды альфа-МЕМ (“ПанЭко”, Россия) и 4 мкл протамина сульфата (5 мг/мл; Sigma, США). Через 6 ч меняли среду в лунках на свежую по 2 мл на лунку. Лентивирус dCAS-VP64 имеет селективный маркер – устойчивость к антибиотику бластицидину. В качестве контроля для селекции использовали интактные клетки HF-mut26-p53, контро-

лем эффективности трансдукции служили HF-mut26. Селекцию начинали через 5 сут после трансдукции. Через 3 нед. выжившие клетки со вставкой лентивируса с dCAS-VP64 пересевали в культуральный флакон T25 и растили до образования монослоя. Затем часть клеток замораживали и хранили при –80°С, а часть сеяли для трансдукции следующим фактором. Таким образом, получили клеточную линию HF-mut26-p53 + dCAS-VP64.

Аналогично проводили трансдукцию фибробластов HF-mut26-p53 и HF-mut26 лентивирусом, кодирующим транскрипционный фактор MS2-P65 HSF1, который имеет маркер для селекции – устойчивость к гигромицину. Далее иммортализованные клетки HF-mut26+dCAS-VP64+MS2-P65_HSF1 трансдуцировали лентивирусом, кодирующим гидовую РНК sgRNA(MS2). Проводили селекцию с помощью антибиотика зеоцина. Получили клеточную линию иммортализованных дисферлиндефицитных фибробластов десны пациента с дисферлинопатией, с ТА-геном дисферлина HF-mut26-p53+dCAS-VP64+MS2-P65_HSF1+sgRNA(MS2) (далее – HF-mut26-p53_TA).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ). Осадок фибробластов собирали с помощью центрифугирования при 500 g в течение 5 мин. Общую РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) по методике, рекомендованной производителем. Количественную ПЦР проводили на амплификаторе CFX96 Touch (BioRad, США) в объеме 20 мкл с применением готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (“Евроген”, Россия) и 5 пмоль каждого праймера. Режим амплификации: 1 цикл 94°С – 180 с; 40 циклов 95°С – 15 с; 60°С – 15 с; 72°С – 15 с. Кривая плавления: 62–94°С с шагом 0.5°С – 15 с. В качестве матрицы выступала кДНК, полученная в ходе ОТ. Праймеры для *DYSF* человека (и клеток C2C12): прямой CGTGATGGATGACAAGAGTGA (C A T G G T G G A T G A C A A G A G C G A); и обратный CGATGGCATAGGGATCAGAAA (C G A T G G C G T A G G G A T C A G A G A).

Количество кДНК, соответствующей транскриптам целевых и референсных генов определяли по разности порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца. В качестве референсного гена был выбран ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Для

количественного анализа экспрессии генов использовали метод $\Delta\Delta C_t$. На первом этапе проводили нормализацию данных, используя усредненные значения C_t референсного гена *GAPDH* и рассчитывали значения ΔC_t , путем вычитания значения C_t референсного гена из значения C_t исследуемого гена. Далее рассчитывали значения $\Delta\Delta C_t$, вычитая значения ΔC_t контрольного образца из значения ΔC_t экспериментального образца.

В качестве положительных контролей использовали миобласты человека без дисферлинопатии и клеточную линию C2C12. Экспрессия *DYSF* в C2C12 была описана в ранних проведенных исследованиях (Belanto et al., 2010; Defour et al., 2014). Отрицательным контролем при анализе клеток HEK293T_TA служили клетки HEK293T, в которых ген *DYSF* не был активирован.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента (двухвыборочный). Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Использованные реактивы: набор антител Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD, США), плазмида pLVUHshp53 (#11653; Addgene plasmid, Patrick Aebischer & Didier Trono); оболочечная плазмида для лентивирусов pCMV-VSV-G (#8454; Addgene plasmid, Bob Weinberg); упаковочная лентивирусная плазмида psPAX2 (#12260; Addgene plasmid, Didier Trono); векторные плазмиды lenti MS2-P65-HSF1_Hygro (#61426), lenti dCAS-VP64_Blast (#61425) и lenti sgRNA(MS2)_zeo backbone (gRNA_1, gRNA_4) (#61427; Addgene plasmid, Feng Zhang); последовательность sgRNA1 CGCCGCGGGCAGGGCGGATC (GenScript, США), бластицидин, гигромицин, зеоцин и TRIzol (Invitrogen, США); qPCRmix-HS (Евроген, Россия), поликлональные антитела кролика к белку p53 (#ab131442), дисферлину (#ab15108) и β -актину (#8227) (Abcam, Великобритания); вторичные поликлональные антитела козы к иммуноглобулину G кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (#A6154; Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типирование фибробластов и получение иммортализованной культуры. Иммунофенотипирование показало специфичность клеток, выделенных из биоптата десны по поверхностным мезенхимным маркерам (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и фибробластов). Проведена характеристика выделенной популяции первичных фибробластов (рис. 2a–e). Для иммортализации нативные фибробласты генетически модифицировали рекомбинантным лентивирусом (pLVUHshp53), кодирующим короткими шпилечными РНК (кшРНК) к нуклеотидной последовательности РНК *p53*. Далее с помощью проточного цитофлуориметра-сортера получали чистую популяцию клеток, несущих LVUHshp53-gfp.

Для проверки успешного нокаута *p53* проведен анализ с помощью вестерн-блоттинга (рис. 3). В качестве контрольных клеток использовали немодифицированные фибробласты десны, полученные от пациента (см. раздел “Материал и методика”), и детектировали продукт, соответствующий по молекулярной массе белку p53 (53 кДа).

Активация транскрипции гена *DYSF* в фибробластах и клетках HEK293. Детекция продуктов экспрессии гена. Гидовая РНК (GenScript, США) для специфичной работы системы SAM (sgRNA1 – CGCCGCGGGCAGGGCGGATC) нацелена на первые 200 п.н. выше сайта начала транскрипции –(TSS) гена *DYSF* и лигирована в gRNA-экспрессионный вектор (pLenti_sgRNA(MS2)_zeo). Далее для осуществления TA гена *DYSF* лентивирусами, кодирующими SAM-gRNA1, dCas9-VP64, MS2-P65-HSF1 были трансдуцированы фибробласты из десны пациента с дисферлинопатией и клетки HEK293T. После этого проводили селекцию клеток антибиотиками: фибробластов – гигромицином (в концентрации 200 мкг/мл), зеоцином (225 мкг/мл) и бластицидином (10 мкг/мл); клеток HEK293T – гигромицином (150 мкг/мл), зеоцином (200 мкг/мл) и бластицидином (7.5 мкг/мл). После селекции получили клетки, в которых прошла генетическая модификация вирусами и, соответственно, TA целевого гена.

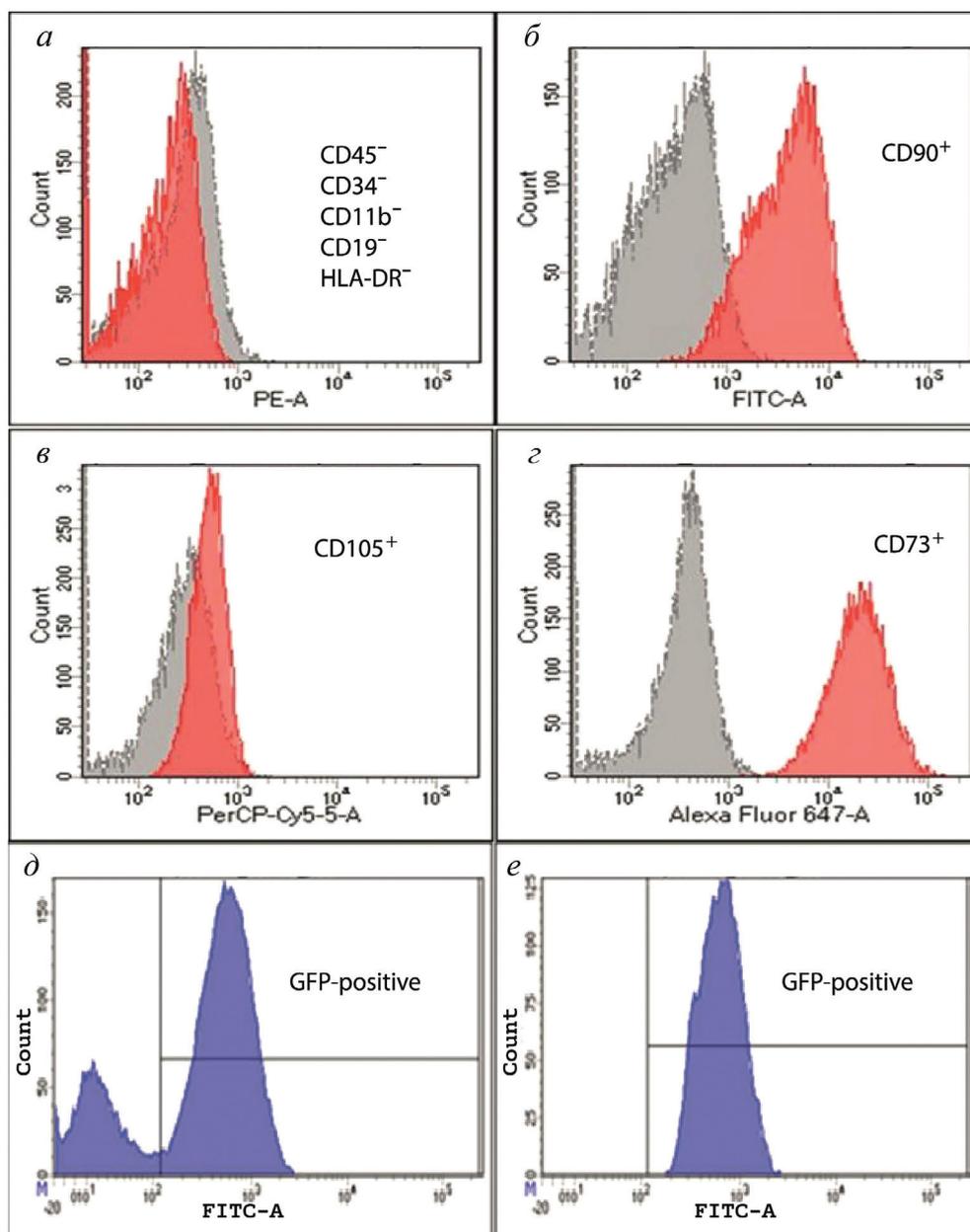


Рис. 2. Распределение фибробластов, выделенных из десны пациента с дисферлинопатией, по поверхностным маркерам (иммунофенотипирование). По вертикали – число клеток; по горизонтали – интенсивность свечения зонда, связанного с соответствующим антителом. *a* – Клетки, негативные по маркерам CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR; *б* – клетки CD90⁺ (94.4%), *в* – клетки CD105⁺ (90.5%), *г* – клетки CD73⁺ (91.5%); *д*, *е* – гистограмма распределения клеточной популяции по интенсивности флуоресцентного сигнала GFP соответственно до и после сортировки. Проточная цитометрия.

Детекция мРНК и белка, кодируемого геном *DYSF*. Методом ОТ-ПЦР было показано, что после активации гена *DYSF* в фибробластах экспрессируется мРНК этого гена (рис. 4а). В качестве положительного контроля использовали миобласты человека (НМб) без мутации в гене *DYSF*, полученные по ранее описанной методике (Був и др., 2020); в качестве отрицательного контроля – фибробласты

с мутацией в 26 экзоне гена *DYSF*, которые не несут компоненты CRISPR/dCas9-SAM.

В культуре клеток НЕК293Т_ТА с помощью ОТ-ПЦР-анализа выявили увеличение уровня экспрессии *DYSF* при использовании праймеров к кДНК дисферлина (рис. 4б). Чтобы убедиться в том, что происходит наработка белка дисферлина, мы проводили иммуноблоттинг. По результатам реакции детектировали бэнд,

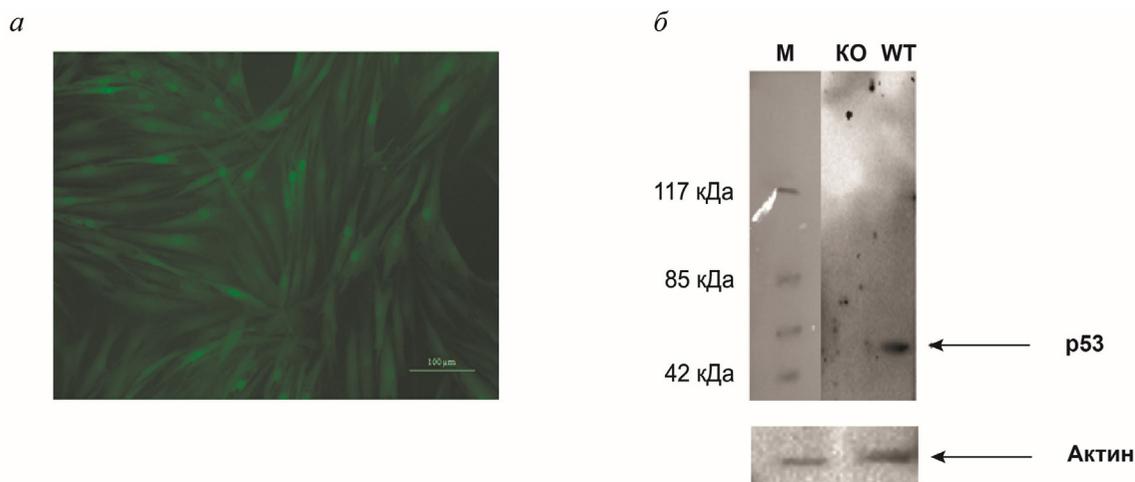


Рис. 3. Детекция нокаута *p53* в фибробластах. *a* – Фибробласты пациента с дисферлинопатией, трансдуцированные лентивирусом LVUHshp53-gfp.3. *б* – Вестерн-блот: КО – иммортализованные фибробласты кожи пациента с дисферлинопатией, полученные путем нокаута гена-онкосупрессора *p53* (53 кДа), WT – фибробласты кожи пациента с дисферлинопатией. М – мол. маркер.

соответствующий ожидаемому размеру белка дисферлина (рис. 4б). Дополнительно оценивали результаты с помощью денситометрии (рис. 4г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Метод для транскрипционной активации генов с применением CRISPR/Cas был впервые описан в 2015 г. (Konermann et al., 2015) и нашел применение в создании подходов к лечению онкологических заболеваний (Liu et al., 2019), ожирения (Wang, 2020), фиброза печени (Luo et al., 2022) и других. Были разработаны индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), постоянно экспрессирующие элементы комплекса SAM–SAM-iPSC (Xiong et al., 2016) и трансгенные мыши (Hunt et al., 2021). SAM-iPSC представляют собой новый полезный инструмент для изучения генетической регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток посредством CRISPR-опосредованной активации генов. На модели мышей SAM также можно модулировать всевозможные состояния с помощью разных направляющих РНК. Такие платформы ТА-генов с CRISPR/dCas9-SAM позволяют направленно изучать патогенез заболеваний и являются удобной моделью для разработки терапии. Ключевыми аспектами и преимуществами CRISPR/dCas9-SAM являются:

1. Эффективность и специфичность. Технология CRISPR/dCas9-SAM обладает высокой

специфичностью к целевому гену, что снижает вероятность случайных мутаций и влияния на другие гены, а также сравнительно высокой эффективностью (Konermann et al., 2015; Wang et al., 2016).

2. Усиленная транскрипция. Система активации позволяет значительно усилить транскрипцию выбранных генов, что может быть весьма полезно при изучении их функций или при разработке генной терапии (Konermann et al., 2015).

Модели *in vitro* являются отправной точкой в биологических и медицинских исследованиях. Ученые используют разные типы моделей – двумерные (2D) модели (монослойные клеточные линии) (Mamchaoui et al., 2011; Xiong et al., 2016; Bruge et al., 2022; Rossi et al., 2023), которые легко изучаются на молекулярном уровне и трехмерные (3D) модели (органойды и органы на чипах), которые имитируют функциональные свойства нативной ткани (Agrawal et al., 2017; Shin et al., 2022). Основная цель состоит в том, чтобы разработать модели, которые сокращают стоимость и время измерений и дают все необходимые объемы экспериментальных данных.

In vitro платформы используют уже многие десятилетия для большого числа заболеваний: остеоартрита (Johnson et al., 2016), псориаза (Jean et al., 2009), заболеваний сердца (Tumiat et al., 1994; Vunjak Novakovic et al., 2014), болезни Альцгеймера (Stoppelkamp et al., 2011), тромбозов (Zhang et al., 2017), разных видов рака

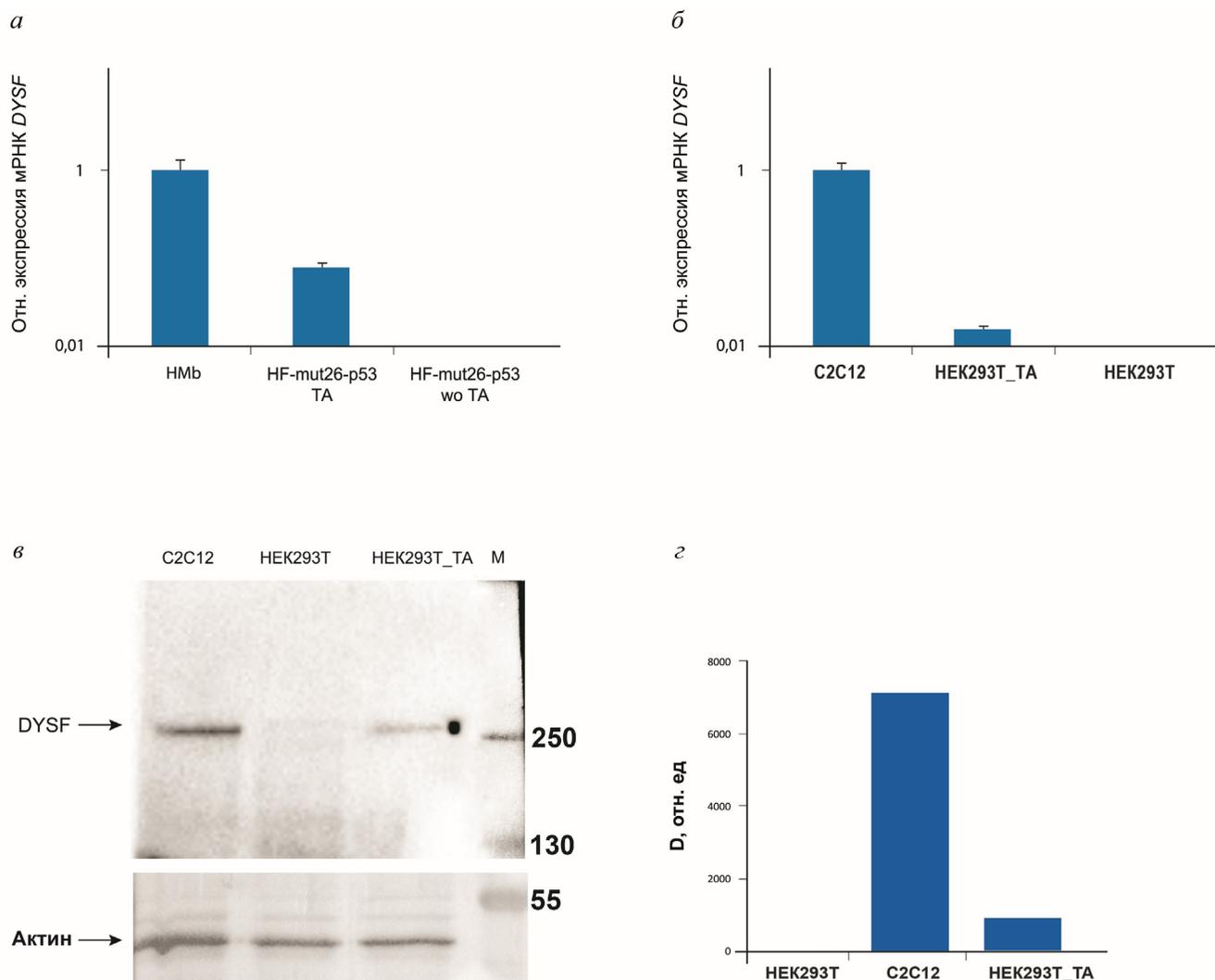


Рис. 4. Детекция мРНК и белка гена *DYSF* в фибробластах и HEK293T до (wo TA) и после (TA) транскрипционной активации гена *DYSF* с помощью CRISPR/dCas9 SAM. *а* – Относительная экспрессия мРНК дисферлина (ΔΔСТ, ОТ-ПЦР) в миобластах человека без мутации в гене *DYSF*, использованных в качестве контрольных клеток (HMb), фибробластах пациента после транскрипционной активации (TA) *DYSF* (HF-mut26-p53_TA) и фибробластах пациента, не несущих компонент системы активации (HF-mut26-p53 wo TA). *б* – Относительная (ΔΔСТ) экспрессия мРНК дисферлина в клетках HEK293T до и после TA *DYSF* и клетках C2C12, которые служили положительным контролем. *в*, *г* – Соответственно вестерн-блоты с антителами к белку дисферлин и их денситограммы (D – оптическая плотность). *а*, *б*: Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.

(Katt et al., 2016) и миодистрофий (Barthelemy et al., 2022; Bruge et al., 2022). Но существует сложность с получением пациент-специфичных линий из-за необходимости проведения высокоинвазивных вмешательств (например, биопсия мышечной ткани). В этом случае возможно применение ТА. Источниками для создания тест-систем в таком случае могут выступать как клетки пациента, относительно легко полученные в амбулаторных условиях (например, фибробласты кожи и десны) (Zorin et al., 2017), так и клетки, которые широко ис-

пользуются в биомедицинских исследованиях (HEK293).

Клеточные культуры, с активированными интересующими генами – это удобная и экономичная платформа для редактирования генома (использование систем редактирования генома в таких культурах позволяет моделировать различные заболевания, а также вносить мутации и изучать влияние той или иной на патогенез) и тестирования генотерапевтических конструкций. Функционирующие в мышечной ткани белки, мутации в которых становятся

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 α /HGF1/FOXA2 reverses hepatic fibrosis via exosome-mediated delivery of CRISPR/dCas9-SAM system. *Nanomed.* V. 17. P. 1411.
<https://doi.org/10.1021/nm-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>
- Szulec 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^{a, b, *}, Y. S. Slesarenko^b, I. G. Starostina^c, A. A. Shaimardanova^c,
 V. V. Solovyova^c, P. A. Bobrovsky^d, E. N. Grafkaia^d, L. D. Belikova^d, S. N. Bardakov^a,
 A. A. Rizvanov^{c, f}, A. A. Isaev^a, R. V. Deev^{a, b, e}

^aArtgene Biotech, Moscow, 119333, Russia

^bOOO Genotarget, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

^cKazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia

^dLopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russia

^eAvtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow 117418, Russia

^fDivision 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