

**Разработка концепта и плана оценки потенциала
нового метода лечения ревматоидного артрита с
помощью технологии редактирования генома**

Выполнил:

К. И. Азьмуков

Научный руководитель:

Н. О. Горбатюк

г. Усть-Лабинск

2024 г.

Оглавление

1. Введение	3
1.1. Актуальность	3
1.2. Проблема	3
1.3. Цель	3
1.4. Задачи.....	3
2. Анализ области исследования	4
2.1. Патогенез.....	4
2.2. Вклад главного комплекса гистосовместимости и его генов	4
2.3. Текущие способы лечения.....	5
2.4. Гипотеза.....	5
3. Методы.....	5
3.1. Получение плазмид из бактериальной культуры	5
3.2. Линеаризация ДНК.....	6
3.3. Дизайн и подготовка олигонуклеотидов	6
3.4. Полимеразная цепная реакция.....	6
3.5. Электрофорез.....	6
3.6. Клонирование в плазмиду.....	7
3.7. Трансфекция в StbI3 E.coli	7
3.8. Получение вирусного вектора.....	7
3.9. Коллагеновая индукция ревматоидного артрита.....	7
4. План эксперимента	7
4.1. Выбор стратегии нокаута	8
4.2. Выбор таргетных последовательностей.....	8
4.3. Выбор способа и вида доставки.....	9
4.4. Выбор вирусных плазмид.....	10
4.5. Получение вирусного вектора.....	10
4.6. Экспериментальный организм.....	11
4.7. Экспериментальные группы.....	11
5. Получение и анализ результатов	12
5.1. Регистрация нокаута.....	12
5.2. Регистрация активности ревматоидного артрита	12
5.3. Оценка потенциала	13
6. Выводы	14
7. Вектор развития.....	14
8. Приложение.....	15

9. Аббревиатуры.....	21
10. Список литературы.....	22

1. Введение

1.1. Актуальность

Ревматоидный артрит – это распространённое хроническое аутоиммунное заболевание, которому подвержено от 0.6% взрослого населения по всему миру [1], интересно, что преимущественно это женщины, а не мужчины (3 к 1 соответственно) [1][2]. Также, болезнь приобретает выраженный характер у людей старше 65 [3], однако воспаление может появиться после 40 [1]. Так, в связи с увеличением длительности жизни, данная проблема становится актуальнее с каждым годом.

Заболевание имеет высокий риск инвалидности: через 3-5 лет половина пациентов становятся нетрудоспособными, а через 20 лет треть становится полными инвалидами [1]. В 2017 году в России было зарегистрировано около 300 тысяч пациентов [1]. Более того, на данный момент не существует эффективного метода лечения ревматоидного артрита, который затрагивал бы первопричину заболевания [1][3].

1.2. Проблема

На сегодняшний день применяются ингибиторы иммунитета или препараты, направленные на симптоматическое лечение [1], таким образом, проблемой является отсутствие этиотропного лечения ревматоидного артрита.

1.3. Цель

Целью данной работы является: разработать концепт нового метода лечения и профилактики ревматоидного артрита и план эксперимента для оценки его потенциала.

1.4. Задачи

Для достижения данной цели были поставлены соответствующие задачи:

- 1) Собрать информацию о патогенезе ревматоидного артрита и способах его лечения;
- 2) На основе полученных данных поставить гипотезу, отражающую разработанный подход;

3) Разработать план эксперимента для оценки потенциала нового подхода к лечению ревматоидного артрита.

2. Анализ области исследования

Для разработки концепта лечения и профилактики РА, необходимо собрать информацию о его патогенезе и, на основе полученных данных, выдвинуть гипотезу, на которой будет базироваться работа.

2.1. Патогенез

Развитие аутоиммунной реакции начинается с презентации патогенных пептидов антиген-презентирующими клетками с помощью главного комплекса гистосовместимости II [4]. После этого, Т-клеточный рецептор связывается с комплементарным ГКГII, что активирует CD4+ Т-клетки, которые, помимо выделения провоспалительных цитокинов, активируют В-клетки. Последние экспрессируют АЦЦП, которые могут связывать, например, коллаген 2 типа, который входит в состав хрящей и синовиальной жидкости [5]; IgG может напрямую участвовать в деструкции сустава [2]; активируют остеокласты и принимают участие в костимуляции Т-клеток [5]. Тем не менее, РА может быть серонегативным, то есть при отсутствии в организме антител РФ или АЦЦП [1][5].

Важную роль играют хондроциты и фибробластоподобные синовиоциты: под действием цитокинов производят ММП и коллагеназу, которые расщепляют внеклеточные белки, способствуя разрушению хрящевой ткани [2][1]. ФПС, мигрируя по кровеносной системе, способствуют распространению воспаления из очага [6]. Более того, под действием цитокинов, остеокласты разрушают костную ткань, что приводит к необратимой деформации [1]. См. рис. 1 в приложении.

2.2. Вклад главного комплекса гистосовместимости и его генов

ЧЛА или human leukocyte antigen (HLA) – комплекс генов, кодирующих белки ГКГ человека. Полиморфный регион: известно более 39000 аллелей генов ЧЛА [7]. В данной работе ключевое значение имеют белки ГКГII и соответствующие им гены 2 класса, т.к. с ними способен связываться CD4 рецептор Т-клеток.

Если карман связывания остатка цитруллина в ГКГII заряжен отрицательно, то цитруллин (его выделяют как главный антиген [1][5]) в пептиде не сможет связаться с ГКГ, т.к. его молекула содержит отрицательно заряженный кислород. Однако если карман связывания остатка цитруллина заряжен положительно или нейтрально, то пептид при связывании имеет большую аффинность и образует патогенный эпитоп (см. рис. 3).

Так, ~80% людей, болеющих РА, имеют общий эпитоп: ОЭ – последовательность аминокислот в бета цепи ГКГП, кодируемой HLA-DRB1; ОЭ включает в себя три аминокислотные последовательности: 70QRRRAA74, 70RRRAA74 или 70QKRAA74 [5]. Ранне-проявившийся РА (до 40 лет) ассоциируется с HLA-DRB1*04:01 (см. рис. 2 и 4) и *04:04 аллелями, в то время как поздний (после 60 лет) ассоциируется с *01:01; наличие ОЭ коррелирует с более высокими титрами АЦЦП и РФ [1][5].

Однако ~20% пациентов с РА не имеют ОЭ; так, наличие лейцина или валина на 11, аланина на 74 и лизина на 74 позиции белка бета цепи ГКГП также ассоциировано с повышенным риском РА [5]. Тем самым, существует множество однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с риском РА.

2.3. Текущие способы лечения

На данный момент нет этиотропного способа лечения ревматоидного артрита, однако курс лекарств может облегчить симптомы и, при благоприятных обстоятельствах, вызвать ремиссию [6][1]. Примером подобных могут быть базисные противовоспалительные препараты (БПВП), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), различные генно-инженерные препараты.

2.4. Гипотеза

Нокаут гена патогенного ГКГП ведёт к неспособности аутоиммунных CD4+ Т-клеток активироваться, из-за отсутствия патогенных эпитопов в виде ГКГП с модифицированными пептидами, что предупреждает развитие ревматоидного артрита.

Тем самым, объектом исследования являются гены ГКГП, а предметом – влияние ГКГП на индукцию иммунного ответа при РА и следствие нокаута гена ГКГП.

3. Методы

Если указано «оставить на ночь», то необходимо оставить на 16 часов

3.1. Получение плазмид из бактериальной культуры

Перед клонированием и трансфекцией необходимо извлечь желаемую плазмиду из бактерий и очистить её [8][9]:

Необходимо добавить полученную культуру к смеси из LB и антибиотика, к которому имеют резистентность бактерии, несущие плазмиду (например, ампициллин). Оставить на ночь при 37 градусах по Цельсию. Поставить в центрифугу для осаждения

бактерий. Добавить растворитель (NaOH и лаурилсульфат натрия) для лизиса и высвобождения плазмид, а после восстанавливающий раствор (ацетат калия, уксусная кислота и дистиллированная вода) для осаждения геномной ДНК. С помощью этанола выделить плазмиду.

3.2. Линеаризация ДНК

Перед клонированием олигонуклеотидов необходимо линеаризовать плазмиду. Смешать плазмиду, рестриктазу (BsmBI) и воду. Выдержать при 55 градусах 3 часа. Используя электрофорез (см. пункт 3.5) выделить ДНК с большей длиной (около 11kbp) [10].

3.3. Дизайн и подготовка олигонуклеотидов

После выбора таргетной последовательности необходимо заказать или синтезировать олигонуклеотиды, имеющие следующую структуру:

gRNA 5`-CACCC_G_target-3`

gRNA-rc 5`-AAAC_targetrc_C-3`

rc – обратная комплементарная последовательность; target – таргетная последовательность. Добавленные последовательности необходимы для клонирования в остов и лучшей экспрессии; отжечь полученные олигонуклеотиды [10].

3.4. Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР необходимо добавить в пробирку необходимые ферменты (в частности, ДНК полимеразу – Taq, Pfu), дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ) и праймеры (в соответствии с задачей).

Программа для отжига олигонуклеотидов (см. в приложении)

Программа для рутинного ПЦР (см. в приложении)

3.5. Электрофорез

Если не указано иное, то электрофорез проводится по стандартной методике в 1% агарозном геле с флуоресцентным красителем. Важно, чтобы полинуклеотиды в контрольной лунке покрывали весь диапазон предполагаемых значений.

3.6. Клонирование в плазмиду

Для клонирования направляющей РНК в трансферную плазмиду необходимо [8]: смешать линейризованную плазмиду (см. пункт. 3.2.), подготовленные олигодуплексы (см. пункт. 3.3.), лигазу и её буфер. Оставить раствор на 30 минут при комнатной температуре (25°C).

3.7. Трансфекция в Stb13 E.coli

Повторяющиеся последовательности в лентивирусном геноме могут быть нестабильными в E.coli. при размножении, в связи с этим используются Stb13 E.coli. неспособные к рекомбинации [8]. Для этого необходимо смешать полученный раствор из пункта 3.6. с реагентами для трансформации и культуру Stb13 клеток. Оставить культуру в LB + антибиотик на ночь при 37 градусах по Цельсию, после выделить полученную плазмиду (см. пункт 3.1.).

3.8. Получение вирусного вектора

Для получения вируса необходимо провести кальциевую трансфекцию в HEK293 клетки. Смешать плазмиды, хлорид кальция, хлорид натрия и другие реагенты (граммовки и подробный рецепт в [8]). Добавить к культуре хлоркин и хранить клетки в инкубаторе при 37°C. После 24 часов необходимо собрать питательную среду (DMEM) шприцом и пропустить её через 0.45-µM фильтр для получения вируса.

После этого следует проверить его вирулентность. Для этого нужно добавить вирус к популяции клеток. Если через 1-2 дня они будут проявлять признак успешной трансдукции (например, светиться), то вирус способен интегрироваться в геном.

3.9. Коллагеновая индукция ревматоидного артрита

Для индукции ревматоидного артрита в мышцы необходимо смешать коллаген с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1; эмульсия вводится интрадермально в основание хвоста; через 7 и 14 дней вводится эмульсия коллагена и неполного адьюванта Фрейнда [16].

4. План эксперимента

См. рис. 8

В качестве эндонуклеазы был выбран белок SpCas9, из-за его избирательности и простоты использования [8][10].

4.1. Выбор стратегии нокаута

Нокаут гена с помощью системы CRISPR/Cas можно осуществить одним из 2-х способов:

1) Создать двунитевый разрыв ДНК (DSB) в первом экзоне гена, что приведёт к его репарации посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), что создаст случайную мутацию (INDEL), которая сдвинет рамку считывания кодонов, что приведёт к образованию раннего стоп-кодона и/или появлению нефункционального белка.

2) Создать два DSB в разных экзонах гена, что приведёт к делеции участка между ними и сшиванию концов. Преимуществом этого метода является то, что его легко идентифицировать с помощью ПЦР (см. пункт 5.1.) и происходит контролируемая полная или частичная делеция гена, в зависимости от выбранных сайтов. Исходя из этого, был выбран данный способ.

4.2. Выбор таргетных последовательностей

Во-первых, необходимо определить ген для нокаута. HLA-DRB1*0401 встречается при раннем РА и имеет ряд патогенных мотивов: ОЭ, аланин на 74, валин на 11, и лизин на 71 позиции. Для демонстрации концепта метода, будет описано проведение нокаута по данному аллелю. Однако, в силу полиморфности генов ГКГII, необходимо точно определить таргетные патогенные аллели. Для этого используется секвенирование и/или серотипирование. Тем самым, согласно тенденциям персонифицированной медицины, для каждого организма необходимо использовать конкретный вирусный вектор, нацеленный на индивидуальный набор патогенных аллелей.

Во-вторых, необходимо определить таргетную последовательность в которой будет нанесён DSB. Первая проблема заключается в том, что хоть гены ЧЛА полиморфны, но они также имеют консервативные участки, присущие другим аллелям (так, в геноме человека до 9 генов DRB1 [11]). Таким образом, при выборе таргетной последовательности, существует риск провести нокаут непатогенных аллелей, что приведёт к ослаблению специфического иммунитета ввиду отсутствия полного спектра генов ГКГII. Вторая проблема заключается в том, что Cas способен допускать ошибки: катализировать DSB там, где таргетная последовательность не полностью комплементарна спейсеру gRNA [10][9]

Для решения первой проблемы было предложено, что таргетная последовательность должна располагаться внутри гипервариабельных экзонов, кодирующих внеклеточную часть ГКГП, которая связывает антигены (во втором и третьем [5]). Так, выбранная таргетная последовательность с большей вероятностью встретится только в патогенном аллеле. Однако на практике необходимо провести секвенирование и/или серотипирование генома ГКГП, для подтверждения того, что таргетная последовательность присутствует только в патогенном гене.

Для решения второй проблемы предлагается использовать интернет-программу [12]. Она, анализируя предложенный участок и полный геном выбранного организма, предлагает оптимальные таргеты для выбранного белка Cas с учётом его PAM.

Ген взят из интернет-библиотеки генов ГКГ Immune Polymorphism Database [13] (см. рис. 4). Длина 2 экзона – 170 bp, а 3 – 282 bp. По результатам обработки (см. рис. 5) были выбраны следующие таргетные последовательности (без PAM) направляющей РНК для второго (А) и третьего (В) экзонов:

gRNA-A: 5`- GTGTCATTTCTTCAACGGGA -3`

gRNA-B: 5`- TCTTCTTCTCCTGGCCGTTС -3`

Они были выбраны из-за отсутствия несоответствий (mismatch), достаточного уровня микрогомологии (выше 6б), оптимального GC состава (от 20% до 80%). Первая находится на нити Уотсона, а другая – на нити Крика.

4.3. Выбор способа и вида доставки

Для проведения нокаута необходимо доставить Cas и gRNA в клетки организма в «том или ином виде»: готовый рибонуклеобелковый комплекс (Cas, связанный с направляющей РНК), матричную РНК или ДНК [21]. Было предложено использовать в качестве носителя геном вируса. Из-за того, что он легко интегрироваться в геном и устойчиво экспрессироваться [8][14][15].

Более того, существует несколько типов вирусов, использующихся для доставки трансгенов. Наиболее распространёнными являются лентивирусные [15] и аденоассоциированные векторы [14]. Было предложено использовать лентивирусный вектор третьего поколения, т.к. процесс трансдукции более быстрый и лёгкий и не требует вируса-хэлпера, и возможна трансдукция вариантом доставки «всё в одном» (и ген Cas и кассета CRISPR на одной плазмиде), но при этом достаточно безопасный для

экспериментального организма [8][9]. Однако в случае высокой оценки потенциала метода необходимо осуществить эксперимент, с помощью ААВ, т.к. он обладает БОльшей безопасностью для реципиента [14], что является абсолютным фактором для применения данного концепта метода на людях (см. пункт 7).

4.4. Выбор вирусных плазмид

Геном лентивируса 3 поколения разделён на 4 плазмиды [9][14]. Все выбранные плазмиды содержат ген резистентности к ампициллину:

Трансферная, содержит гены, кодирующие белок Cas, место для клонирования кассеты CRISPR и белок-маркер для идентификации успешной трансдукции. Была выбрана плазида Lenti-Cas9-gRNA-GFP (Addgene no. 124770 [9]; см. рис. 6). Эта лентивирусная трансферная плазида третьего поколения предназначена для трансдукции в клетки млекопитающих, содержит ген SpCas9, ген зелёного флуоресцентного белка и сайт для вставки направляющей РНК.

Две упаковочные плазмиды. Была выбрана плазида pMDLg/pRRE (Addgene no. 12251 [9]) и pRSV-Rev (Addgene no. 12253 [9]). Конвертная плазида pMD2.G (Addgene no. 12259 [9]).

4.5. Получение вирусного вектора

Для получения вируса необходимо размножить полученные бактерии и выделить из них плазмиды (из пункта 4.4.) (см. пункт 3.1.). Синтезировать или заказать олигонуклеотиды и подготовить их (см. пункт 3.3.). В данном примере используются следующие олигонуклеотиды:

gRNA-A: 5`- CACCGTGTTCATTTCTTCAACGGGA -3`

gRNA-A-rc: 5`- AAACTCCCGTTGAAGAAATGACAC -3`

gRNA-B: 5`- CACCGTTCTTCTTCTCCTGGCCGTTTC -3`

gRNA-B-rc: 5`- AAACGAACGGCCAGGAAGAGAAGAC -3`

Клонировать gRNA в остов (см. пункт 3.6.) и провести трансфекцию полученного материала в Stb13 E. coli и после выделить трансферную плазмиду (см. пункт 3.7.). Получить вирусный вектор (см. пункт 3.8.).

4.6. Экспериментальный организм

Т.к. цель работы – оценить потенциал метода, то имеет смысл провести опыты на экспериментальном организме, а не на человеке. В качестве ЭО была выбрана мышь *Mus musculus* (mm10). Из-за лёгкости искусственной индукции РА [6] и широкого выбора плазмид для трансдукции [9], а также её геном был проанализирован при выборе таргетной последовательности (см. пункт 4.2). Для бОльшей имитации патогенеза человека будут использованы трансгенные мыши с человеческим геном ГКГП [6][16].

4.7. Экспериментальные группы

Для всесторонней оценки потенциала данной методики необходимо применить метод на разных стадиях развития ревматоидного артрита. Количество особей в каждой группе равно 6, из-за того, что в каждой РА протекает несколько по-разному, например, в связи с разным полом (3 мужского и 3 женского в группе); более того, также учитывается смертность от РА и вирусного вектора. Возраст каждой особи на время индукции РА (см. пункт 3.9.) равен пяти месяцам.

1) До индукции РА: введение вирусного вектора за три месяца до индукции заболевания. Данный срок был выбран из-за того, что в организме уже имеются антиген-презентирующие клетки с патогенным ГКГП, следовательно, необходимо время для их апоптоза и появления модифицированных из гемопоэтических клеток костного мозга [17]. Имитирует профилактику РА при обнаружении у пациента патогенных аллелей.

2) Во время начала обострения РА: введение вирусного вектора при появлении первых симптомов РА (через 3-5 недель после первого введения коллагена [16]). Имитирует лечение РА при обнаружении у пациента первых симптомов и подтверждении тестов (см. пункт. 5.2.).

3) При запущенном случае РА: введение вирусного вектора при появлении выраженных признаков РА (через 1-3 месяца после первого введения коллагена [16], при наличии видимых изменений в анатомии суставов). Имитирует индукцию ремиссии при запущенном РА.

4) Контрольная группа, у которой был индуцирован РА без введения вектора.

5. Получение и анализ результатов

5.1. Регистрация нокаута

Главными клетками, нокаут которых влияет на протекание болезни, являются антиген-презентирующие клетки и гемопоэтические клетки костного мозга, т.к. из них созревают первые. Предлагается взять пробы из клеток паннуса и из костного мозга бедренной кости. После, необходимо выделить ДНК этих клеток и провести рутинную ПЦР (см. пункт 3.4.) со следующими праймерами (см. рис. 7):

А) Праймеры, взятые внутри удаляемого сегмента (синие стрелки на рис. 7): если после гель-электрофореза будут найдены отрезки ДНК длины продукта этих праймеров, то делеция гена не удалась. В данном примере они будут внутри 2 интрона.

Предлагаемые праймеры:

Прямой: 5`- TGTTATATTTTACATAGTTGAAA -3`

Обратный: 5`- ATTTTCAACSTATTGGTGAATGTCA -3`

Длина продукта (~1340 bp)

Б) Праймеры, взятые по бокам удаляемого сегмента (красные стрелки в рис. 7): если после гель-электрофореза будут найдены отрезки ДНК предполагаемой длины, то делеция удалась; но если будут найдены отрезки ДНК длиной примерно в удаляемый участок, то делеция не удалась.

Предлагаемые праймеры:

Прямой: 5`- GGTAAGCCTTTAAATGGTAAAGG -3`

Обратный: 5`- GAAACTCAGTCTCAGACCCAGAGG -3`

Длина продукта (~ 400 bp) – успех делеции

Длина продукта (~ 4600 bp) – присутствие экзонов и интрона

Пробу на нокаут следует взять через 3 недели после индукции РА.

5.2. Регистрация активности ревматоидного артрита

После подтверждения нокаута необходимо проверить действенность метода – активность иммунитета при РА. На практике его отражает индекс DAS28 [1].

$$DAS28 = (0,56 (\text{ЧБС})) + (0,28 (\text{ЧПС})) + (0,70 \ln(\text{СОЭ})) + (0,014 \text{ООСЗ}), \text{ где}$$

ЧБС/ЧПС – число болезненных/припухших суставов; СОЭ – скорость оседания эритроцитов по методу Вестергрена; ООСЗ – общая оценка пациентом состояния здоровья. Однако, в связи с использованием модельного организма, было предложено изменить данную формулу:

$$DAS28 = 0,42 * (\text{ЧПС}) + 0,70 * \ln(\text{СОЭ}) + 0,014 * 50$$

Более того, следует взять дополнительные пробы из крови и измерить титры следующих антител:

- 1) Ревматоидный фактор [18];
- 2) Антител к коллагену 2 типа [16];
- 3) Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду [18][1].

Активность РА: по официальным критериям, ревматоидный артрит считается активным, если DAS28 выше или равен 3.2 [1]. При этом имеются высокие титры одного или нескольких патогенных антител и опухшие суставы.

Ремиссия или отсутствие РА: по официальным критериям, считается, что произошла ремиссия или РА отсутствует, если DAS28 ниже или равен 3.2 [1]. А также имеются низкие титры патогенных антител или антитела отсутствуют вовсе.

Вышеописанные пробы следует брать через 3 недели после индукции РА каждую неделю.

5.3. Оценка потенциала

Высокий: данный метод показал свою эффективность в лечении и профилактики РА, рекомендуется дальнейшее его изучение на других моделях. При благоприятном исходе в одной из 3 групп (см. пункт 4.7.): первой РА не появился на протяжении всей жизни организма и/или во второй и/или третьей произошла ремиссия.

Средний: данный метод, при его доработках, имеет потенциал стать способом лечения и профилактики РА. В первой РА появился позже в сравнении с контрольной

группой (КГ) и/или во второй РА перешёл в тяжёлую стадию (произошло повреждение кости и/или хряща) позже в сравнении с КГ и/или в третьей произошла временная ремиссия.

Низкий: данный метод показал свою неэффективность в отношении лечения и профилактики РА. В первой группе РА появился в то же время, что и в КГ, во второй и третьей не произошло ремиссии.

6. Выводы

1) Анализ литературных данных показал, что ревматоидный артрит является актуальной современной проблемой, для решения которой требуется применение концептуально новых методов лечения, т.к. существующие терапевтические подходы не всегда позволяют решить поставленные задачи по улучшению качества жизни пациента.

2) На почве вышесказанного, была поставлена гипотеза, отражающая разработанный концепт, преимуществом которого является остановка развития аутоиммунитета, а не его замедление.

3) Была выполнена цель: был разработан план проекта, реализация которого позволит разработать новый инновационный подход для лечения социально значимого заболевания.

7. Вектор развития

При получении необходимого оборудования и реактивов провести вышеописанный эксперимент с целью выявления потенциала метода.

Стоит отметить, что это вспомогательная статья, которая может послужить основанием для проведения более крупного исследования с повышенными мерами безопасности, как адено-ассоциированный вирус, и на наиболее перспективных группах, которые могут быть выявлены в ходе этой работы. В противном случае, реализация данного плана покажет, что данный подход не перспективен в отношении лечения ревматоидного артрита.

Более того, данный подход может послужить базой для разработки методов терапии ряда других заболеваний, в основе патогенеза которых лежат аутоиммунные механизмы, связанные с презентацией патогенных белков на главном комплексе гистосовместимости, например, рассеянный склероз или диабет 1 типа.

8. Приложение

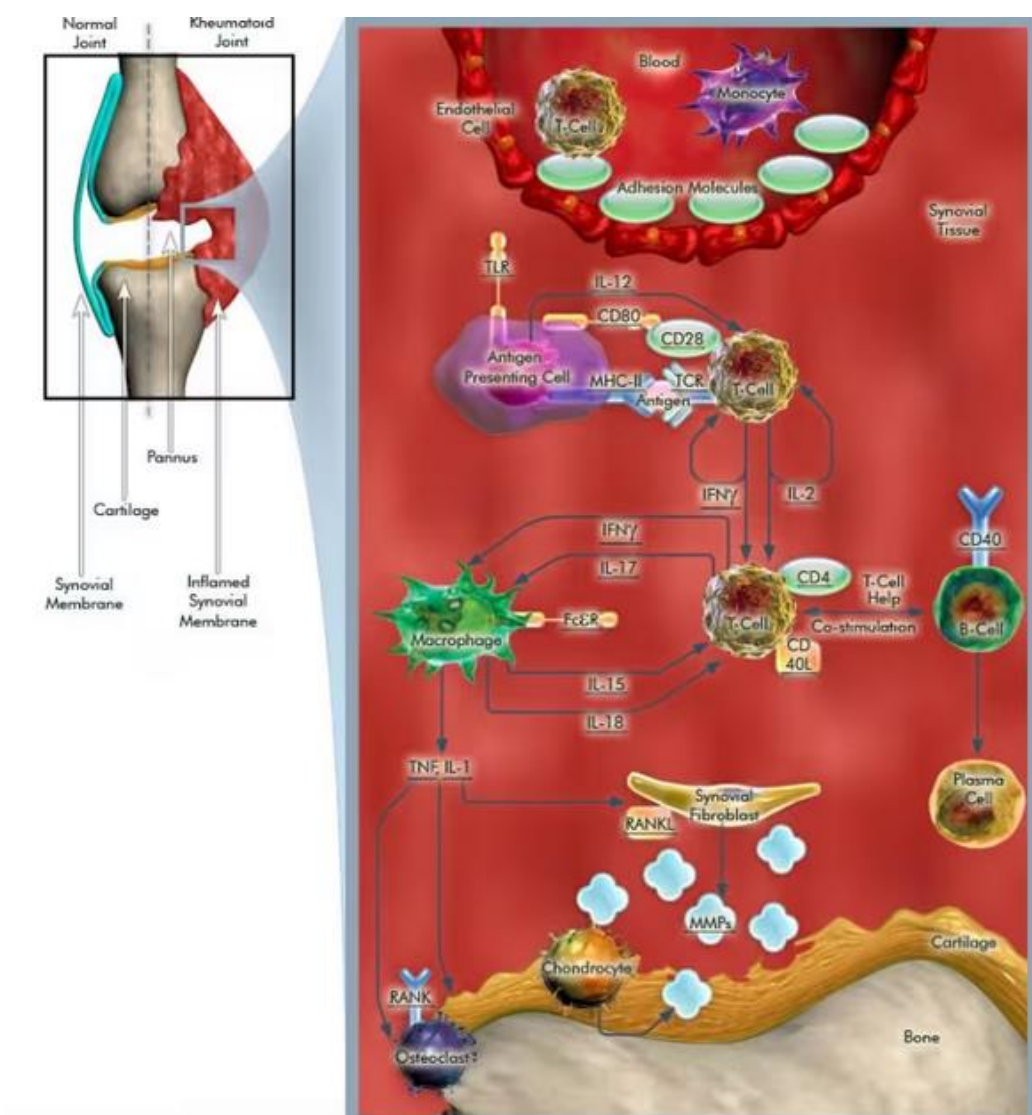


Рис. 1. Патогенез РА. Показано утолщение синовиальной оболочки вследствие пролиферации синовиоцитов, инфильтрация иммунных клеток, активация Т-клетки антигенпрезентирующей клеткой, коstimуляция Т-клетки и В-клетки, взаимодействие макрофага и Т-клетки, повреждение хряща вследствие производства ММП синовиоцитами и остеокластами, разрушение костной ткани остеокластом [2].



Рис. 2. Кристаллическая структура ГКП, кодируемого DRB1*0401, в комплексе с модифицированным пептидом альфа-энолазы 26-40 с цитруллином на 32 позиции. Зелёный – альфа цепь; фиолетовый – бета цепь; салатный – пептид альфа-энолазы. Код: 5JLZ. [19]

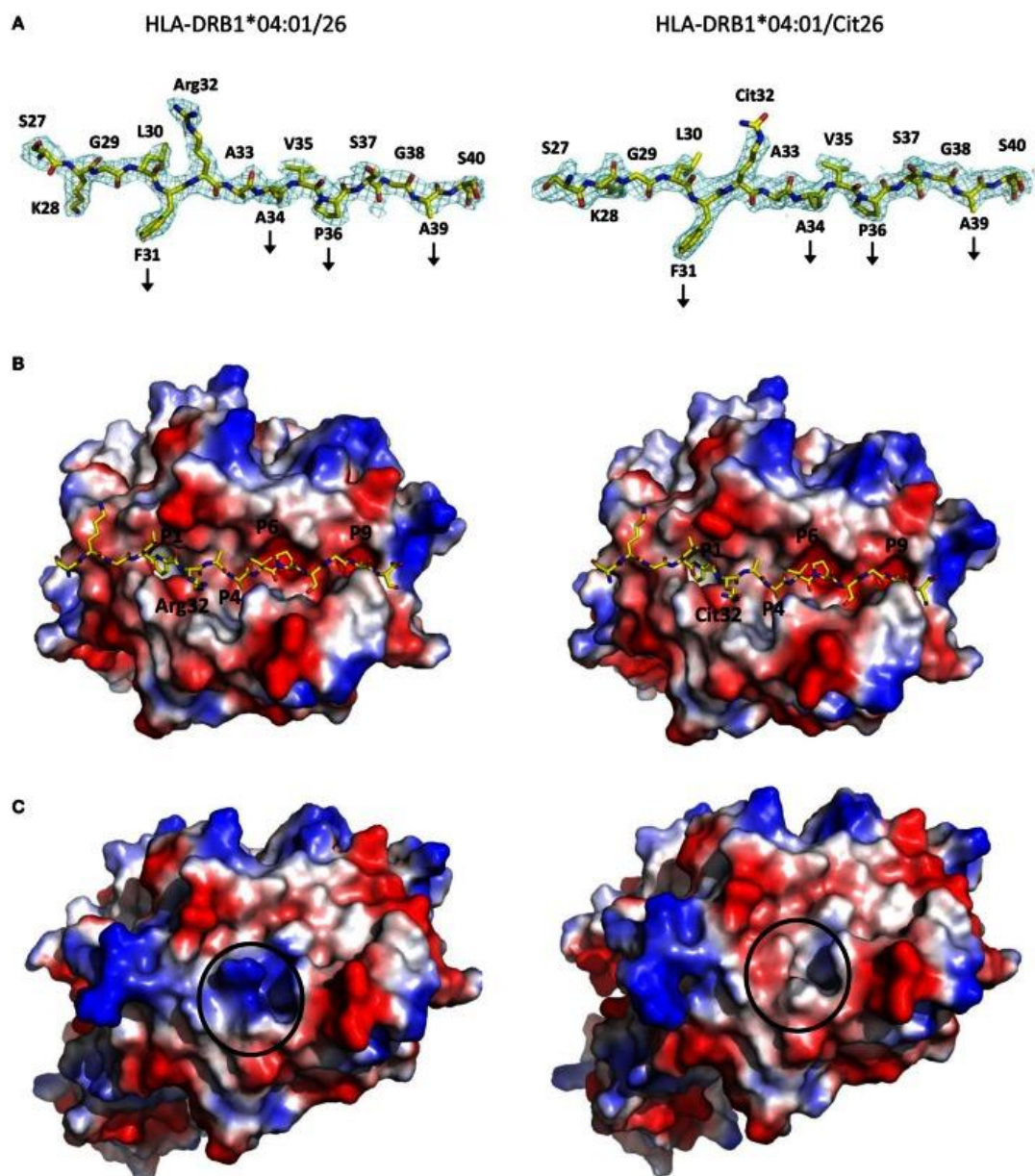


Рис. 3. А) структура пептидов альфа-энолазы: слева с аргинином, справа с цитруллином.

В) Электронное облако ГКГП, содержащего DRB1*04:01, без учёта расположенных пептидов и их положение в сайте связывания. С) Электронное облако с учётом пептидов, отмечено ключевое отличие. Р – карман связывания. Вид на ГКГП сверху от клеточной мембраны. [4]

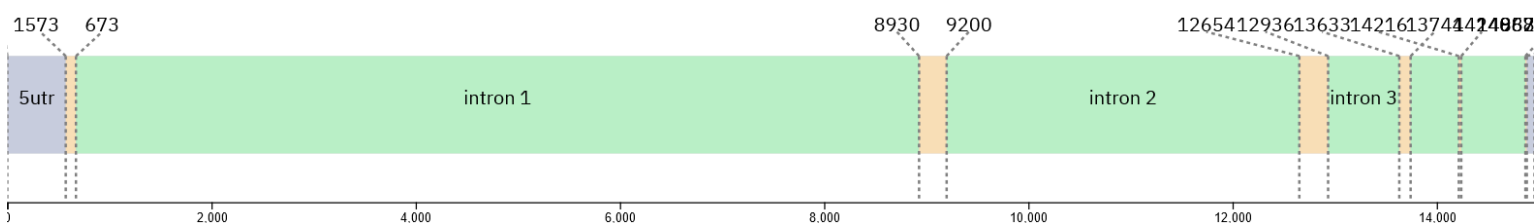


Рис. 4. Структура гена HLA-DRB1*04:01:01:01. Intron – интрон, экзон показан жёлтым цветом, utr – не транслируемая область [13].

RGEN Target (5' to 3')[?]	Position[?]	Cleavage Position (%) [?]	Direction[?]	GC Contents (% w/o PAM)[?]	Out-of-frame Score[?]	Mismatches[?]		
						0	1	2
CATGAGTGTCAATTTCTTCAACGG	24	24.0	+	35.0	66.8	0	0	1
ATGAGTGTCAATTTCTTCAACGGG	25	24.6	+	35.0	59.2	0	0	1
GTGTCAATTTCTTCAACGGGACGG	29	26.9	+	45.0	70.8	0	0	0
ATTTCTTCAACGGGACGGAGCGG	34	29.9	+	50.0	71.6	0	0	0
TTTCTTCAACGGGACGGAGCGGG	35	30.5	+	55.0	65.7	0	0	0
TCAACGGGACGGAGCGGGTGCGG	40	33.5	+	70.0	57.6	0	0	0
GACGGAGCGGGTGCGGTTCTCGG	47	37.7	+	75.0	56.9	0	0	0
GGTGATAGAAGTATCTGTCCAGG	65	41.9	-	45.0	61.2	0	0	3
CAGATACTTCTATCACCAAGAGG	71	52.1	+	40.0	41.1	0	0	1
CGAAGCGCACGTACTCTCTTGG	86	54.5	-	60.0	34.7	0	0	1
CGTGCGCTTCGACAGCGACGTGG	98	68.3	+	70.0	51.1	11	6	2
GTGCGCTTCGACAGCGACGTGGG	99	68.9	+	65.0	52.7	0	2	0
TGCGCTTCGACAGCGACGTGGGG	100	69.5	+	65.0	57.6	0	0	0
GCGCTTCGACAGCGACGTGGGGG	101	70.1	+	70.0	61.4	0	0	0
ACAGCGACGTGGGGGAGTACCGG	109	74.9	+	65.0	64.5	0	0	0
CTCCTGGTCTGCTGTGAATGG	157	62.0	+	55.0	65.3	0	0	0
AACCATTACAGAGCAGACCAGG	159	58.8	-	50.0	84.6	0	0	0
TCTGTGAATGGTTTCTATCCAGG	169	66.3	+	40.0	64.6	0	0	0
ATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGG	185	72.0	+	50.0	65.5	0	0	0
CACCTGACTTCAATGCTGCCTGG	187	68.8	-	55.0	64.5	0	1	1
CAGGCAGCATTGAAGTCAGGTGG	188	73.1	+	55.0	74.3	0	1	1
GCATTGAAGTCAGGTGGTTCCGG	194	75.3	+	50.0	63.9	0	1	1
GAAGTCAGGTGGTTCCGGAACGG	199	77.1	+	55.0	74.7	0	2	1
CAGGTGGTTCCGGAACGGCCAGG	204	78.9	+	70.0	67.1	0	0	0
TCTTCTTCTCTGGCCGTTCCGG	213	78.1	-	55.0	72.1	0	0	0
AACGGCCAGGAAGAGAAGACTGG	217	83.5	+	55.0	63.9	0	0	0
ACGGCCAGGAAGAGAAGACTGGG	218	83.9	+	55.0	65.3	0	0	3
CGGCCAGGAAGAGAAGACTGGGG	219	84.2	+	60.0	62.3	0	0	1
CCAGGAAGAGAAGACTGGGGTGG	222	85.3	+	60.0	61.6	0	0	9
CCACCCAGTCTTCTTCTCTGG	222	81.4	-	60.0	62.4	0	0	7

Рис. 5. Сверху – предложенные таргетные последовательности для второго экзона, снизу – для третьего. RGEN Target – таргетная последовательность gRNA эндонуклеазы; position – позиция первого нуклеотида в экзоне; cleavage position – относительная позиция DSB в экзоне; direction – направление (на верхней или нижней нити); GC contents – GC состав в

процентах; out-of-frame – микрогомологический вне рамочный балл; mismatches – несоответствия [12].

Created with SnapGene®

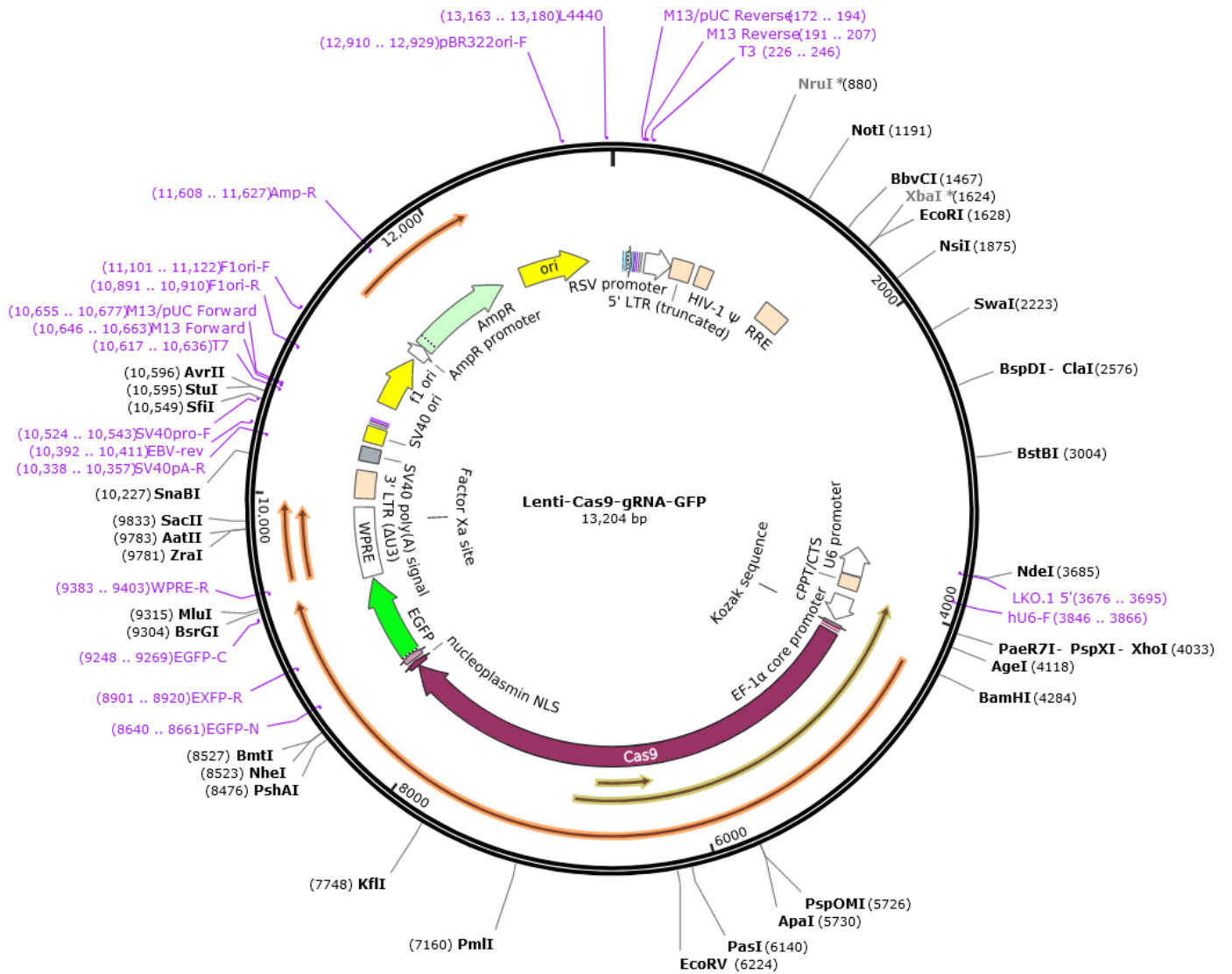


Рис. 6. Структура трансферной плазмиды Lenti-Cas9-gRNA-GFP (Addgene no. 124770). [9]

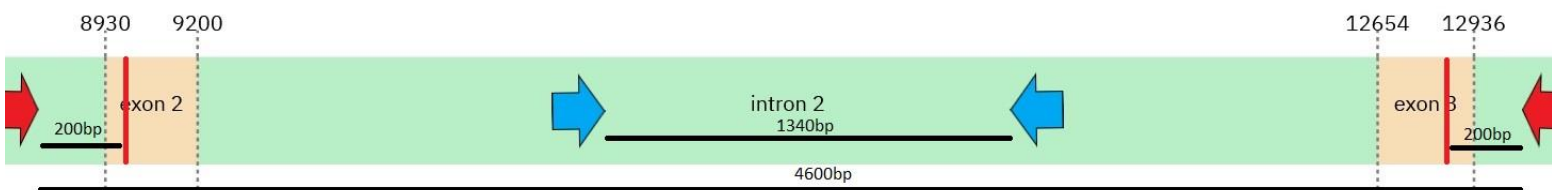


Рис. 7. Расположение праймеров в гене HLA-DRB1*04:01:01:01. Синие стрелки – праймеры не-делеции, а красные стрелки – праймеры делеции. Вертикальные красные полосы – места нанесения двунитевого разрыва [10]. Intron – интрон, экон – экзон. [13]

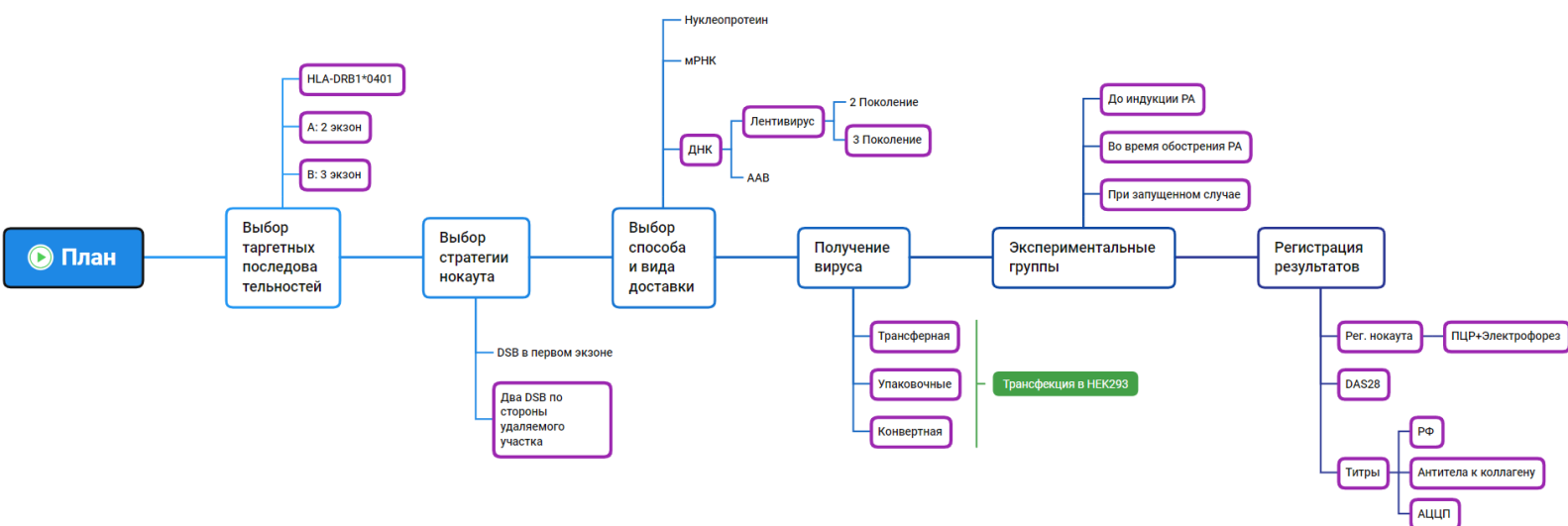


Рис. 8. Схема эксперимента. Сделано в XMind.

Программа для отжига олигонуклеотидов [8]:

30 минут - 37°C

5 минут – 95°C

5 минут – 90°C

5 секунд – 80°C

30 секунд – 70°C

30 секунд – 60°C

1 минута – 50°C

2 минуты – 40°C

2 минуты – 30°C

Удержание на 4°C

Программа для рутинного ПЦР [20]:

Предварительный этап:

98°C на 30 секунд

35 Циклов:

98°C на 10 секунд

72°C на 60 секунд

Заключительный этап:

72°C на 10 минут

Удержание на 10°C

9. Аббревиатуры

АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

ГКГП-II – главный комплекс гистосовместимости первого и второго типа соответственно

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КГ – контрольная группа

ММП – матриксная металлопротеиназа

ОЭ – общий эпитоп

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РФ – ревматоидный фактор

Спейсер – spacer (последовательность из 20 нуклеотидов (SpCas) в направляющей РНК, которая комплементарна участку, в котором производится расщепление ДНК)

ФПС – фибробластоподобные синовиоциты

ЧЛА – человеческий лейкоцитарный антиген

ЭО – экспериментальный организм

bp – base pairs (пар оснований)

Cas – CRISPR associated protein (белок, ассоциированный с CRISPR)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

CRISPR – clustered regulatory interspaced short c repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (среда для роста клеток млекопитающих)

DSB – double strand break (двунитевый разрыв ДНК)

gRNA – guide RNA (направляющая РНК)

HLA - human leukocyte antigen (человеческий лейкоцитарный антиген)

INDEL – insertion/deletion (вставка/делеция)

LB - lysogeny broth (лизогенный бульон)

NHEJ – non-homology end joining (негомологичное соединение концов)

10. Список литературы

[1] Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Ревматоидный артрит. ID:250. Год утверждения: 2021. Перепросмотр не позднее 2023. Разработчик клинической рекомендации: Ассоциация ревматологов России, ОООИ «Российская ревматологическая ассоциация «Надежда»».

[2] <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/cell-signaling-pathways/pathogenesis-rheumatoid-arthritis.html> Thermo Fisher Scientific. Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.

[3] Kobak S, Bes C. An autumn tale: geriatric rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2018 Jan;10(1):3-11. doi: 10.1177/1759720X17740075. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29290762; PMCID: PMC5724645.

[4] Gerstner C, Dubnovitsky A, Sandin C, Kozhukh G, Uchtenhagen H, James EA, Rönnelid J, Ytterberg AJ, Pieper J, Reed E, Tandre K, Rieck M, Zubarev RA, Rönnblom L, Sandalova T, Buckner JH, Achour A, Malmström V. Functional and Structural Characterization of a Novel HLA-DRB1*04:01-Restricted α -Enolase T Cell Epitope in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2016 Nov 14;7:494. doi: 10.3389/fimmu.2016.00494. Erratum in: *Front Immunol.* 2017 Oct 04;8:1236. PMID: 27895642; PMCID: PMC5108039.

- [5] Wysocki T, Olesińska M, Paradowska-Gorycka A. Current Understanding of an Emerging Role of HLA-DRB1 Gene in Rheumatoid Arthritis-From Research to Clinical Practice. *Cells*. 2020 May 2;9(5):1127. doi: 10.3390/cells9051127. PMID: 32370106; PMCID: PMC7291248.
- [6] Kong JS, Jeong GH, Yoo SA. The use of animal models in rheumatoid arthritis research. *J Yeungnam Med Sci*. 2023 Jan;40(1):23-29. doi: 10.12701/jyms.2022.00773. Epub 2022 Nov 22. PMID: 36411592; PMCID: PMC9946911.
- [7] <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.
- [8] Giuliano CJ, Lin A, Girish V, Sheltzer JM. Generating Single Cell-Derived Knockout Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Mol Biol*. 2019 Sep;128(1):e100. doi: 10.1002/cpmb.100. PMID: 31503414; PMCID: PMC6741428.
- [9] <https://www.addgene.org/> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.
- [10] Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp*. 2015 Jan 3;(95):e52118. doi: 10.3791/52118. PMID: 25549070; PMCID: PMC4279820
- [11] Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. 2007 Feb 28;48(1):11-23. doi: 10.3349/ymj.2007.48.1.11. PMID: 17326240; PMCID: PMC2628004.
- [12] <http://www.rgenome.net/cas-designer/> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024. Bae S., Park J., & Kim J.-S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014).
- [13] <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/alleles/allele/?accession=HLA00685> Открытый доступ. Дата обращения: 28.01.2024.
- [14] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 May;18(5):358-378. doi: 10.1038/s41573-019-0012-9. PMID: 30710128; PMCID: PMC6927556.
- [15] Dong W, Kantor B. Lentiviral Vectors for Delivery of Gene-Editing Systems Based on CRISPR/Cas: Current State and Perspectives. *Viruses*. 2021 Jul 1;13(7):1288. doi: 10.3390/v13071288. PMID: 34372494; PMCID: PMC8310029.

- [16] Rajesh Rajaiah, Kamal. D. Moudgil. Rheumatoid Arthritis 2009, Pages 218-224, CHAPTER 8N - Animal Models.
- [17] Förster I, Rajewsky K. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4781-4. doi: 10.1073/pnas.87.12.4781. PMID: 2352948; PMCID: PMC54201.
- [18] <https://www.msmanuals.com/ru-ru/профессиональный/нарушения-со-стороны-скелетно-мышечной-и-соединительной-ткани/заболевания-суставов/ревматоидный-артрит-ра> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.
- [19] <https://www.rcsb.org/3d-view/> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.
- [20] <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530> Открытый доступ. Дата обращения: 27.01.2024.
- [21] Duan L, Ouyang K, Xu X, Xu L, Wen C, Zhou X, Qin Z, Xu Z, Sun W, Liang Y. Nanoparticle Delivery of CRISPR/Cas9 for Genome Editing. Front Genet. 2021 May 12;12:673286. doi: 10.3389/fgene.2021.673286. PMID: 34054927; PMCID: PMC8149999.