

Разработка подхода подавления экспрессии гена *DUX4* с помощью siРНК в миобластах больных миодистрофией Ландузи-Дежерина

Кривошеева И. А., Вяхирева Ю. В., Табаков В. Ю., Скоблов М. Ю.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Миодистрофия Ландузи-Дежерина (МЛД) – распространённое наследственное заболевание, вызываемое эктопической экспрессией гена *DUX4* в мышечных клетках. Метод подавления экспрессии генов при помощи siРНК зарекомендовал себя как эффективный и безопасный способ генной терапии без вмешательства непосредственно в геном. В данной работе мы продемонстрировали возможность трансфекции миобластов человека целевыми siРНК без ущерба жизнеспособности и дальнейшей дифференцировке этих клеток в миотубы. Также мы показали различия в профиле экспрессии генов-мишеней *DUX4* между миобластами, полученными от здоровых людей и от пациентов с МЛД. В дальнейшем эти данные могут помочь при разработке эффективных и специфичных siРНК для терапии МЛД.

Ключевые слова: миодистрофия Ландузи-Дежерина, siРНК, миобласты, трансфекция.

Для цитирования: Кривошеева И. А., Вяхирева Ю. В., Табаков В. Ю., Скоблов М. Ю. Разработка подхода подавления экспрессии гена *DUX4* с помощью siРНК в миобластах больных миодистрофией Ландузи-Дежерина. *Медицинская генетика* 2021; 20(3): 47-56.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.03.47-56

Автор для корреспонденции: Кривошеева И.А.; **e-mail:** Irina-Krivosheeva-92@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 25.02.2021

Development of an approach to knockdown of *DUX4* gene by siRNA in myoblasts derived from patients with FSHD

Krivosheeva I. A., Vyakhireva Yu. V., Tabakov V. Yu., Skoblov M. Yu.

Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechye str. 1, Moscow, 115522, Russia

Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is a common hereditary disease caused by ectopic expression of the *DUX4* gene in muscle cells. The method of suppressing gene expression using siRNA has been shown to be an effective and safe method of gene therapy without interfering directly with the genome. In this work, we demonstrated the possibility of transfecting human myoblasts with targeted siRNAs without compromising the viability and further differentiation of these cells into myotubes. We also showed differences in the expression profile of *DUX4* target genes between healthy and patient-derived myoblasts. In the future, these data can be used to develop effective and specific siRNAs for the treatment of FSHD.

Keywords: FSHD, *DUX4* protein, siRNA, myoblasts, transfection.

For citation: Krivosheeva I. A., Vyakhireva Yu. V., Tabakov V. Yu., Skoblov M. Yu. Development of an approach to knockdown of *DUX4* gene by siRNA in myoblasts derived from patients with FSHD. *Medical genetics*. 2021; 20(3): 47-56. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.03.47-56

Corresponding author: I.A. Krivosheeva; **e-mail:** Irina-Krivosheeva-92@yandex.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. Author declare no conflicts of interest.

Accepted: 25.02.2021.

Лицевлечелопаточная миодистрофия или миодистрофия Ландузи-Дежерина (МЛД, OMIM 158900) является третьей по распространённости мышечной дистрофией после миодистрофии Дюшенна и миотонической дистрофии. Её частота в по-

пуляции в среднем достигает 1:15000-1:20000 человек [1]. При МЛД поражаются мышцы пояса верхних конечностей и лица. Причиной развития МЛД является эктопическая экспрессия гена *DUX4*. Продукт экспрессии гена *DUX4* – транскрипционный фактор, содер-

жащий двойной гомеобокс домен [2, 3]. В норме этот ген экспрессируется на зародышевых стадиях, а во взрослом состоянии его транскрипция подавлена метилированием ДНК повторов D4Z4 [4, 5].

Выделяют 2 типа МЛД, отличающихся друг от друга молекулярно-генетической причиной, но практически не различимых по клиническим проявлениям. При МЛД I типа происходит уменьшение числа субтеломерных макросателлитных повторов D4Z4 в регионе 4q35. У здоровых индивидуумов их число составляет от 11 до 150, к заболеванию приводит уменьшение числа повторов до 10 и менее [6], в результате чего метилирование, способствующее подавлению этого региона, становится неэффективным. Если после последней субъединицы повторов располагается особая последовательность нуклеотидов, называемая В гаплотипом, происходит экспрессия мРНК гена *DUX4*. Для развития клинических проявлений достаточно экспрессии *DUX4* в одном из тысячи ядер [4, 7]. При МЛД II типа уменьшения числа повторов D4Z4 не происходит, однако мутации в гене *SMCHD1* приводят также к аномальной экспрессии гена *DUX4* и к фенотипу МЛД [8]. Наследование МЛД I типа — аутосомно-доминантное. До 1/3 случаев представляют случаи *de novo* [9]. При втором типе МЛД говорят о более сложном диалогическом наследовании.

Золотым стандартом диагностики МЛД является саузерн-блот гибридизация для определения длины повторов D4Z4, но этот метод не мог объяснить некоторые случаи заболевания. Углубление знаний о молекулярной структуре 4q35 региона, а также основах патогенеза МЛД позволило установить причину заболевания все в большем числе случаев и провести медико-генетическое консультирование пациентов.

Вследствие достаточно большой распространенности заболевания всегда вставал вопрос о поиске эффективного средства терапии. Был проведен ряд клинических испытаний ингибитора миостатина и β -агонистов, но на сегодняшний день ни в одном из них не доказана эффективность этих препаратов [10–12]. Применение пациентами комбинации антиоксидантов не привело к значимым улучшениям в тесте 2-минутной ходьбы, но лабораторные биомаркеры показали изменения в положительную сторону [13]. Кроме того, были разработаны протоколы хирургического вмешательства для улучшения качества работы плечевых мышц и устранения косметических дефектов [14, 15].

Ни одно из генотерапевтических средств не дошло до клинических испытаний, но попытки их разработки с использованием различных подходов предпринимались неоднократно. Например, применение ан-

тисмысловых олигонуклеотидов и siРНК для целевого подавления экспрессии гена *DUX4* явилось достаточно эффективным как *in vitro* на культурах клеток [16], так и *in vivo* при доставке молекул внутримышечной инъекцией [7]. Не так давно была разработана система на основе аденоассоциированного вирусного вектора, что позволило аккумулировать терапевтический эффект и улучшить состояние мышей [17]. Также на клеточных культурах была протестирована модифицированная система CRISPR-dCas9 с транскрипционным репрессором KRAB, показана возможность применения такой методики в терапии пациентов [18]. В этой работе исследовали также влияние системы на возможные дополнительные мишени и показали отсутствие побочных эффектов. Но пока эта система не тестировалась *in vivo*. Подходы с антисмысловыми олигонуклеотидами разных видов (siРНК и АСОН) применялись и для подавления транскрипционных мишеней *DUX4*, что уменьшало фенотипические проявления [19, 20].

При изучении структуры повторов D4Z4 были обнаружены кластеры miРНК на антисмысловой цепи ДНК, которые могли бы регулировать экспрессию *DUX4* с D4Z4 повторов [21]. В результате экспериментов было обнаружено, что эти miРНК и аналогичные им искусственные siРНК могут привлекать белки DICER и AGO, модифицирующие структуру повторов и их доступность для активной транскрипции. Этот механизм представляется довольно интересным для разработки возможной терапии, как активатор внутренних механизмов подавления экспрессии генов в области повторов D4Z4.

В нашей работе мы выбрали siРНК таким образом, чтобы они располагались в промоторной области, и протестировали их на immortalized клеточных линиях от пациентов с МЛД и здоровых доноров.

Материалы и методы

Клеточные культуры

В работе были использованы 3 ранее охарактеризованные линии immortalized миоцитов [22]. Способ immortalization — трансдукция векторами, экспрессирующими факторы immortalization CDK4 и hTERT [23]. Одна из этих линий — миоциты, полученные из паравертебральной мышцы здорового мужчины, 16 лет (линия 1190 K). Вторая линия получена из клеток подлопаточной мышцы мужчины 27 лет, число повторов D4Z4 — 2 (186 FSHD). Третья получена из клеток мышц спины мужчины 26 лет, число повторов D4Z4 — 6,3 (1080 FSHD). Линии были любезно предоставлены Егором Васецким (Ph.D. Directeur de Recherche CNRS Chromatin Dynamics and Metabolism in

Cancer, Institut Gustave Roussy, Франция). Клетки культивировали на пролиферативной среде (ММ)* с антибиотиками при 37 °C и 5% CO₂ до достижения ими 30-40% конфлюэнтности. Перед трансфекцией заменяли среду на (ММ)* без антибиотиков. После инкубации с трансфицирующим агентом в течение 24 часов заменяли среду на 1 мл свежей среды (ММ)* с антибиотиками. Через 24 часа культуры ополаскивали DPBS и вносили в лунки с клетками дифференцировочную среду (DM-M). Дифференцировочную среду заменяли на свежую через каждые 48 часов. Оценку степени дифференцировки миобластов проводили микроскопически с интервалом 24 часа.

Состав пролиферативной среды (ММ)*: основа — среда F12, с добавлением 15% ЭТС, 1,5 мкг/мл НС (гидрокортизон), 2 мМ глутамин, 10 нг/мл FGF-b. Если не указано иное, к среде добавляли антибиотик (раствор пенициллин-стрептомицин) до концентрации однократного.

Состав дифференцировочной среды (DM-M): основа — среда DMEM с добавлением 2% HS (сыворотка лошадиная) и 2 мМ глутамин. Если не указано иное, к среде добавляли антибиотик (раствор пенициллин-стрептомицин) до концентрации однократного [24].

Дизайн siРНК

siРНК были подобраны к промоторному региону гена *DUX4* в пределах региона 550±100 нуклеотидов от сайта начала транскрипции при помощи созданной в лаборатории программы. Программа проходит по заданной последовательности гена и проверяет каждый 19-нуклеотидный фрагмент этой последовательности на соответствие эмпирическим правилам, изложенным в статье [25]. За выполнение или не выполнение этих правил олигонуклеотиду присваиваются или отнимаются баллы (табл. 1). Последовательности с наибольшим счётом проверяли с помощью инструмента BLAST и при отсутствии совпадения с нецелевыми генами использовали для работы. В качестве контрольной (siRNA4) была использована последовательность siРНК из [21]. В качестве отрицательного контроля нокдауна (siControl) использована последовательность из [26]. Последовательности представлены в табл. 2.

Трансфекция миобластов

Трансфекция миобластов проводилась в 12-луночном планшете при достижении клетками 40%-ной конфлюэнтности. Трансфекция при помощи METAFECTENE® PRO (Biontex) проводилась в следующих условиях: 100 пмоль siРНК в 30 мкл PBS + 4 мкл METAFECTENE® PRO в 30 мкл PBS на одну лунку смешивали в пробирке объемом 1,5 мл, инкубиро-

вали 15 минут и добавляли по 65 мкл смеси к среде без антибиотика, в которой растут клетки. Кальций-фосфатную трансфекцию проводили при помощи собственных реагентов лаборатории. Кальций-фосфатная трансфекция проводилась следующим образом: 50 пмоль siРНК и 250 ммоль Са в 50 мкл H₂O + 50 мкл HBS двукратного тщательно перемешивали, инкубировали 20 мин и добавляли по 100 мкл смеси к среде, в которой растут клетки. Трансфекция при помощи Lipofectamine 3000 (Invitrogen) проводилась в следующих условиях: 150 пмоль siРНК в 50 мкл PBS + 3 мкл Lipofectamine 3000 в 50 мкл PBS инкубировали 15 мин и добавляли по 100 мкл смеси в среду, в которой растут клетки.

Для контроля эффективности трансфекции была использована неспецифическая siРНК, меченая флуоресцентным красителем (FAM). Оценку доли клеток, несущих флуоресцентную метку, проводили методом проточной цитометрии.

Экспрессионный анализ

Для анализа экспрессии целевых генов через 96 часов после трансфекции миобластов была выделена мРНК. РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [27]. Выделенную РНК обрабатывали ДНК-эндонуклеазой I (Диалат Лтд) в соответствии с рекомендациями производителя. Проверку эффективности ДНКазы проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Проверку целостности РНК проводили с помощью гель-электрофореза. РНК, свободную от ДНК, использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с помощью рандомных гексануклеотидов и обратной транскриптазы (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ экспрессии гена *DUX4* и его генов-мишеней (*ZSCAN4*, *TRIM43*, *RFPL2*, *MBD3L2*) проводили так же с помощью ПЦР-РВ. Последовательности праймеров представлены в табл. 3.

Анализ экспрессии генов-мишеней в различных клеточных линиях проводили методом ΔCt, сравнение проводили со средним значением Ct референсных генов *B2M*, *HPRT*, *TFRC*, *TBP*. Последовательности праймеров приведены в статье [28].

Анализ изменения экспрессии генов-мишеней в результате действия siРНК проводили методом 2^{ΔΔCt}, в качестве референсных использовали те же гены, что и при экспрессионном анализе.

Статистическая обработка результатов

Все статистические оценки проводились с использованием программного обеспечения STATISTICA 8.0.

Правила, по которым программа подбора siРНК присваивает баллы каждому олигонуклеотиду

Параметр (смысловая цепь)		Счёт
Содержание G/C нуклеотидов 30-50%		-100 если не выполняется
A/U на 3'-конце больше, чем на 5'-конце		10
Нуклеотид А		1 за каждый
Нуклеотид С		-1 за каждый
Позиция	Нуклеотид в составе смысловой цепи	Счёт
1	G/C	1
3	A	1
3	C	-1
5	C	-1
6	A/U	1
7	C	-1
8	U	1
10	A/U	1
10	C	-1
11	G	-1
13	G/C	1
13	G	-1
14	G	-1
16	A	1
17	G	-1
19	A/U	1
19	G/C	-1
Рекомендованные нуклеотиды в составе смысловой цепи		Счёт
AAC		1 за каждый
UC		1 за каждый
UG		1 за каждый
AAG		1 за каждый
AGC		1 за каждый
UCU		1 за каждый
UCCG		1 за каждый
CU		1 за каждый
UCC		1 за каждый
CG		1 за каждый
AUG		1 за каждый
GCG		1 за каждый
UUU		1 за каждый
ACA		1 за каждый
UUC		1 за каждый
CAA		1 за каждый

Не рекомендованные нуклеотиды в составе смысловой цепи	Счёт
CUA	-1 за каждый
GU	-1 за каждый
GAU	-1 за каждый
ACGA	-1 за каждый
GCC	-1 за каждый
GUGG	-1 за каждый
CCC	-1 за каждый
GGC	-1 за каждый
CCG	-1 за каждый
GGG	-1 за каждый
CAG	-1 за каждый
GAG	-1 за каждый
GCA	-1 за каждый
AUA	-1 за каждый
CUG	-1 за каждый
AG	-1 за каждый
GG	-1 за каждый
GGA	-1 за каждый

Измерения были получены, по крайней мере, в трех повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Для сравнения групп выборок использовались U-критерий Манна–Уитни и критерий Колмогорова–Смирнова. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика культур миобластов

Для экспериментов по нокдауну гена *DUX4* были использованы иммортализованные культуры миобластов. Анализ морфологии этих культур не выявил различий между недифференцированными миобластами здорового человека и пациентов с МЛД, что согласуется с данными других авторов [29]. В образцах здоровой культуры наблюдалось образование миотуб уже через сутки культивирования в дифференцировочной среде, тогда как в образцах культур миобластов, полученных от пациентов, образования миотуб не наблюдалось через 48 часов после индукции дифференцировки (рис. 1), что также согласуется с результатами экспериментов [30], в которых контрольные миобласты начинали дифференцировку раньше, чем клетки с эктопической экспрессией *DUX4*.

После дифференцировки «здоровых» и «поражённых» миобластов в миотубы был проведён анализ экспрессии гена *DUX4* и его генов-мишеней. Он показал, что ген *DUX4* в наших культурах экспрессирует

Таблица 2

Последовательности siРНК, использованных в работе

Название	Последовательность 5'-3'	Локализация
siRNA1	GAATCCATCGTCAGGCCAT	-600
siRNA2	TCTGGTCTTCTACGTGGAA	-547
siRNA3	GGAGGTTTCAGTTCCACACT	-419
siRNA4	CCGGAAACATGCAGGGAAG	-650
siControl	AGGTAGTGTAAATCGCCTTG	---

Таблица 3

Последовательности праймеров для детекции *DUX4* и его мишеней

Ген	Праймеры	
<i>DUX4_c</i>	F	5'-GGCCCGGTGAGAGACTCCACA-3'
	R	5'-CCAGGAGATGTAACCTAATCCAG-GTTTGC-3'
<i>DUX4_1</i>	F	5'-CGCGGAGAACTGCCATT-3'
	R	5'-CCAGAATTTACGGAAGAACAAG-3'
<i>ZSCAN4</i>	F	5'-GACCTGACTGATGACAGCATAA-3'
	R	5'-GTGGTTTGGGCATTCACTTG-3'
<i>TRIM43</i>	F	5'-AACACCGGGAGAACTCTTAAA-3'
	R	5'-CTGATCATCTGTGCCCCGTAAA-3'
<i>RFPL2</i>	F	5'-TGAGATGAACCCAAGGATG-3'
	R	5'-TCTTGCCGATTCTGTCTGATG-3'
<i>MBD3L2</i>	F	5'-GCCAGGAGGGTGAAGAAAG-3'
	R	5'-TGACAATTCAGAGTAGGAATGAGG-3'

ся на недостаточном уровне для детекции методами гнездовой ПЦР или ПЦР-РВ (данные не показаны). Гены-мишени *DUX4*, напротив, хорошо экспрессируются в клетках, полученных от пациентов. В соответствии с нашими ожиданиями, гены-мишени *DUX4* практически не экспрессируются в линии здоровых миобластов. Уровень экспрессии генов-мишеней в «больных» и «здоровых» линиях миобластов различался в 3 — 3000 раз в зависимости от конкретного гена и линии (рис. 1).

Оптимизация трансфекции миобластов

В качестве средства доставки siРНК в миобласты были использованы различные методы трансфекции клеток: два типа липофекции (при помощи реагентов METAFECTENE® PRO и Lipofectamine 3000) и катионная трансфекция (кальций-фосфатная трансфекция). Трансфекция считалась успешной, если больше 70% клеток, трансфицированных меченой siРНК, демонстрировали флуоресценцию выше базальной (аутофлуоресценции клеток или трансфицирующе-

го агента). Сравнение эффективности трансфекции миобластов с помощью METAFECTENE® PRO и Lipofectamine 3000 представлено на рис. 2.

На первом этапе была проведена трансфекция миобластов при помощи реагента METAFECTENE® PRO. Трансфекция прошла с высокой эффективностью и без видимых признаков апоптоза. Однако, после индукции дифференцировки было установлено, что этот реагент ингибирует переход миобластов в миотубы. Даже через 96 часов после трансфекции в линиях 1080FSHD и 186FSHD не было заметных признаков дифференцировки, а миобласты здорового донора (1190K) образовывали примерно в 2 раза меньше миотуб после воздействия METAFECTENE® PRO, чем контрольные образцы этой же линии (данные не показаны). Поскольку для проведения эксперимента требуется оценивать скорость дифференцировки миобластов при подавлении *DUX4* и экспрессию генов-мишеней *DUX4* в клетках на стадии миотуб, от дальнейшего использования этого реагента было решено отказаться.

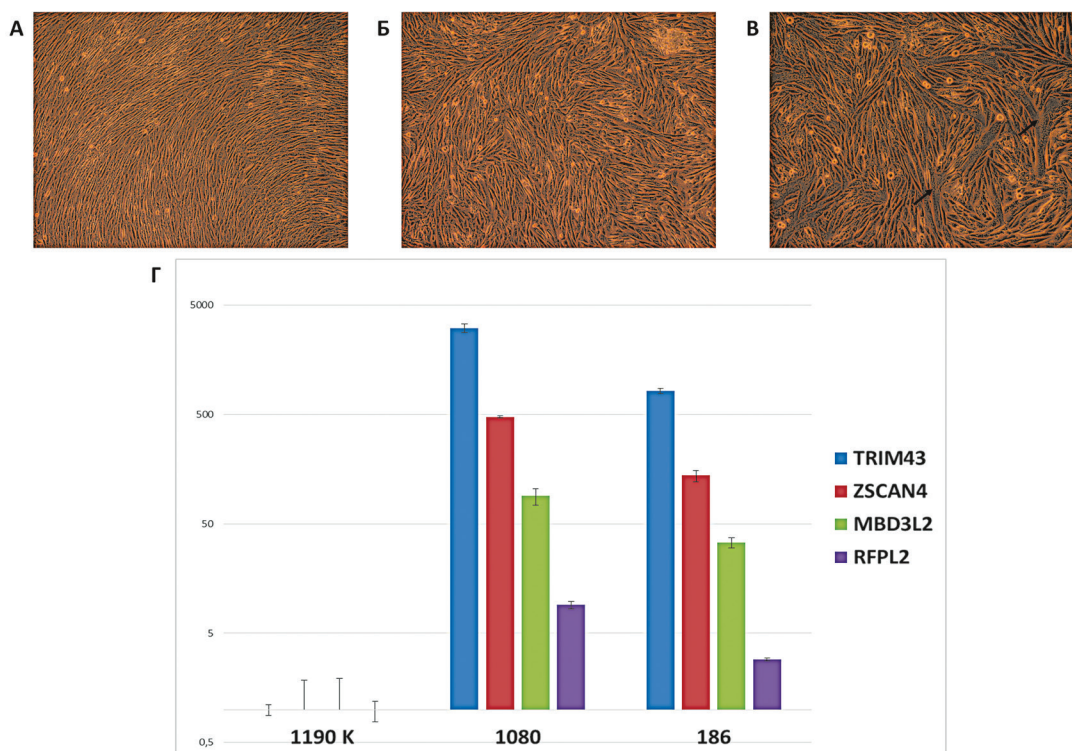


Рис. 1. Характеристика клеточных линий. А-В. Микрофотографии клеточных линий миобластов на 4 день после индукции миогенной дифференцировки. А, Б – линии больных МЛД, миотубы ещё не образовались; В – контрольная клеточная линия, миотубы начали формироваться (стрелка). Г. Экспрессионный анализ генов-мишеней *DUX4* в линии «здоровых» (1190K) и «больных» (1080 и 186) миобластов. Показана относительная экспрессия по сравнению со средним значением 4-х генов «домашнего хозяйства». Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Различия достоверны.

Далее была проведена трансфекция кальций-фосфатным методом. Кальций-фосфат образует преципитаты с нуклеиновыми кислотами, которые затем попадают в клетки в результате эндоцитоза. Однако, обработка кальций-фосфатом миобластов показала токсический эффект преципитатов для всех клеточных линий. Миобласты демонстрировали визуально видимые признаки апоптоза (ошаривание, фрагментация клеток) уже через 6 часов инкубации с преципитатами, а через 24 часа после трансфекции все они погибли. Уменьшение концентрации реагента, времени инкубации комплексов и частоты смены среды после трансфекции не привели к значительному ослаблению токсического эффекта.

Далее была проведена трансфекция с помощью реагента Lipofectamine 3000. Эффективность трансфекции составила в среднем 95%, видимых признаков апоптоза не было обнаружено ни сразу после трансфекции, ни спустя 48 часов. Дифференцировка миобластов происходила одновременно в трансфицированных и нетрансфицированных линиях, что говорит о том, что Lipofectamine 3000 не ингибирует переход миобластов в миотубы. В дальнейшем эксперименты по нокдауну *DUX4* были проведены с использованием этого реагента.

Экспрессионный анализ нокдауна гена *DUX4*

Для дизайна siРНК была выбрана промоторная область гена *DUX4*. При помощи, созданной нами программы были выбраны три перспективные после-

довательности siРНК в пределах региона -650 ± 100 нуклеотидов от сайта начала транскрипции (список используемых последовательностей приведен в табл. 2). В качестве положительного контроля нокдауна нами была использована последовательность siРНК из статьи [21], где эффективность подавления экспрессии гена *DUX4* при трансфекции этой siРНК составила 89%, а снижение экспрессии генов-мишеней достигало 92%.

Спустя 48 часов после успешной трансфекции миобластов был индуцирован процесс дифференцировки. Поражённые клетки дифференцировались медленнее, чем «здоровые» миобласты, во всех группах образцов. Через 96 часов после индукции дифференцировки все клеточные образцы достигли дифференцированного состояния (образовали множество миотуб). Для оценки подавления экспрессии гена *DUX4* в этих образцах из них была выделена РНК и проведён анализ экспрессии генов-мишеней *DUX4*. Анализ показал, что контрольная siRNA4, которая в статье [21] понизила экспрессию генов-мишеней на 92%, в наших экспериментах подавила *DUX4* значительно слабее: в линии миобластов 1080FSHD снижение экспрессии гена *TRIM43* составило 8%, *ZSCAN* – 20%, *RFPL2* – 24%, экспрессия *MBD3L2* не снизилась. В линии миобластов 186FSHD снижение экспрессии гена *TRIM43* составило 8%, *ZSCAN* – 20%, *RFPL2* – 18%, *MBD3L2* – 12%. Остальные siРНК, разработанные нами и направленные на промоторную область гена *DUX4*, снизили экспрессию некоторых генов-мишеней на 8-10%, но в большинстве случаев изме-

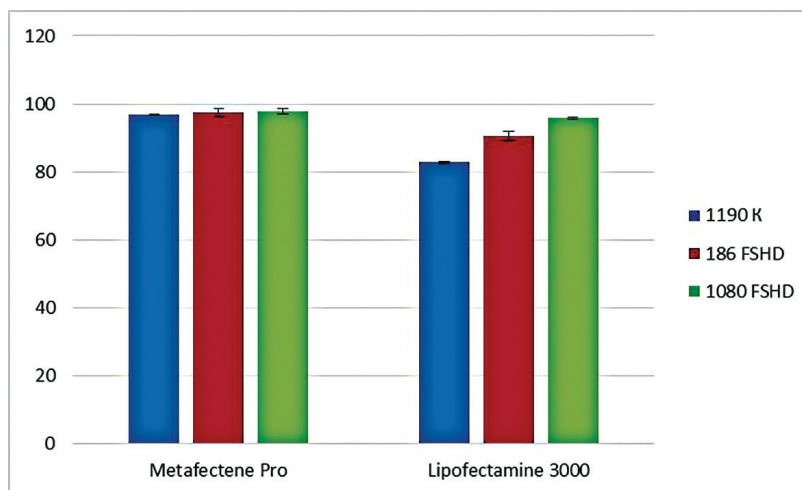


Рис. 2. Эффективность различных методов липофекции «здоровых» (1190K) и «больных» (1080 и 186) миобластов. Эффективность трансфекции как METAFECTENE® PRO, так и Lipofectamine 3000 составила более 80% для всех линий миобластов. Поскольку кальций-фосфатная трансфекция привела к гибели клеток, анализ эффективности для неё не проводили. Результат получен в трёх повторностях. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

нение экспрессии оказалось статистически незначимым. Более того, siRNA1 способствовала повышению экспрессии генов-мишеней в 1,4-1,6 раз в клетках линии 1080FSHD (рис. 3).

Обсуждение

Ген *DUX4* в норме функционирует на зародышевых стадиях, таким образом, этот ген ассоциирован с полипотентностью. Это обстоятельство хорошо согласуется с нашими наблюдениями о том, что миобласты пациентов с МД медленнее, чем здоровые, дифференцируются в миотубы, которые затем должны стать мышечной тканью. Эктопическая экспрессия гена *DUX4* является основной причиной развития МЛД.

Так как *DUX4* – транскрипционный фактор, запускающий каскад активации последующих регуляторных генов, даже очень низкой экспрессии *DUX4* достаточно для проявления клинических симптомов [31]. Исследования показывают, что в мышечных тканях больных МЛД только 1 из 1000 миобластов [4] или 1 из 200 ядер миотуб [31] синтезирует мРНК *DUX4*, что делает детекцию экспрессии этого гена затруднительной. В исследованиях, посвящённых МЛД, авторы прибегают к различным способам выявления мРНК гена *DUX4*: гнездовой ПЦР [4], иммуноблоттингу [31], ПЦР в реальном времени генов-мишеней [21]. Последний способ представляется наиболее эффективным, так как уровень экспрессии генов-мишеней *DUX4* в несколько раз выше, чем уровень экспрессии *DUX4*. В нашей работе мы оценивали сте-

пень подавления экспрессии гена *DUX4* по изменению экспрессии его генов-мишеней. В качестве маркерных генов выбирали гены-мишени, которые, согласно экспериментальным данным, имели более чем в 2 раза увеличенную экспрессию в ответ на активацию экспрессии гена *DUX4* [2]. В результате экспрессионного анализа нами был разработан способ опосредованной оценки экспрессии гена *DUX4* по уровню транскрипции его генов-мишеней (*ZSCAN4*, *TRIM43*, *RFPL2*, *MBD3L2*). Мы показали, что линии миобластов, полученные от пациентов с диагностированным МЛД, при дифференцировке в миотубы экспрессируют гены-мишени *DUX4* на достаточно высоком уровне в отличие от здоровых клеток.

В наших экспериментах мы также обнаружили, что миобласты очень чувствительны к выбору трансфицирующего реагента. Так, METAFECTENE® PRO ингибирует дифференцировку миобластов и образование миотуб. Так как METAFECTENE® PRO является липопротеидным реагентом, образующим липосомы, которые затем объединяются с мембраной клеток, он, по-видимому, нарушает каким-то образом процесс объединения миобластов при формировании миотуб. Интересно, что эффективность трансфекции METAFECTENE® PRO была достаточно высокой. Таким образом, мы видим, что трансфекция прошла и это, по-видимому, нарушало процесс дифференцировки.

Кальций-фосфат, напротив, высокой эффективности трансфекции не обеспечивал. Хотя другие клеточные линии хорошо переносят трансфекцию кальций-

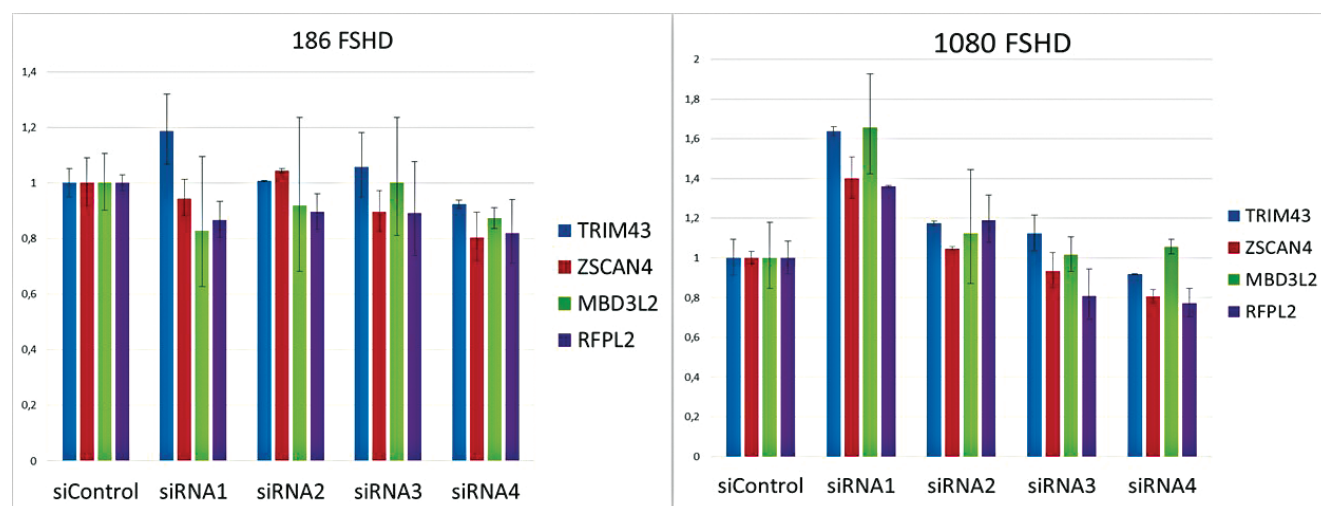


Рис. 3. Экспрессионный анализ нокдауна *DUX4* в линиях пациентов, поражённых МЛД. Экспрессия генов в условиях трансфекции контрольной неспецифической siPHK – siControl принята за единицу. siRNA1-3 – разработанные нами малые интерферирующие РНК, siRNA4 – положительный контроль нокдауна. Результат получен в пяти технических повторностях. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

фосфатом [32], использованные нами линии миобластов по какой-то причине не производят эндоцитоз, необходимый для доставки siРНК таким способом. Кроме того, есть предположение, что, будучи молекулой РНК без оболочки из липопротеинов или подобных реагентов, siРНК в составе преципитатов с кальций-фосфатом быстро уничтожается внеклеточными РНК-нуклеазами. В конечном итоге мы выяснили, что кальций-фосфатная трансфекция не подходит для линий миобластов 1080FSHD и 186FSHD.

Третий использованный нами реагент для трансфекции, Lipofectamine 3000, показал хорошую эффективность трансфекции (83-95%, рис. 2) и отсутствие ингибирования дифференцировки миобластов. В результате трансфекции этим реагентом нам удалось получить результаты, подтверждающие подавляющую активность siРНК из статьи [21], а также активирующую активность одной из наших siРНК. Полученные результаты о подавляющей активности siРНК из статьи [21] не вполне соответствуют результатам, представленным для этой siРНК в оригинальной статье. Так как мы использовали сходные реагенты и концентрации siРНК для подавления экспрессии гена, причина различий, возможно, лежит в разном генетическом контексте, так как клеточные линии, использованные в работе, отличаются от наших. Подтверждением этой версии служит также то, что линии миобластов, использованные в данной работе, продемонстрировали различный уровень подавления экспрессии генов-мишеней, несмотря на одинаковые условия культивирования, трансфекции и анализа экспрессии (рис. 3).

Для дизайна siРНК нами была выбрана промоторная область гена *DUX4*, так как по литературным данным [21] направление в эту область олигонуклеотидов может приводить к привлечению к промотору метилирующих агентов и, как следствие, к транскрипционному замалчиванию региона. Известно, что промоторная область генов содержит как энхансеры, так и сайленсеры транскрипции. Некоторые антисмысловые олигонуклеотиды направляют на промоторные области генов, чтобы усилить их экспрессию [33]. Точный механизм такого эффекта ещё предстоит выяснить, как и принципы, по которым тот или иной участок промоторной области при контакте с антисмысловым олигонуклеотидом активирует или подавляет экспрессию соответствующего гена.

Низкий уровень экспрессии гена *DUX4* делает культуру миобластов пациентов сложным объектом для разработки подходов к терапии, так как при использовании siРНК экспрессия этого гена может понижаться, что может быть затруднительно детектировать. Модельные организмы более адекватны этим за-

дачам, и на них можно наблюдать эффекты от siРНК на более длинном промежутке времени. В нашей работе мы обнаружили один из участков, который, судя по косвенным признакам (экспрессия генов-мишеней *DUX4*), потенциально может активировать экспрессию *DUX4* ещё сильнее, чем это делает уменьшение числа повторов. Согласно работам других авторов [2], активация экспрессии гена *DUX4* приводит к увеличению экспрессии его генов-мишеней, а поскольку мы направляли siРНК именно на этот ген, то увеличение экспрессии генов-мишеней рассматриваем как результат усиления экспрессии гена *DUX4*. Это очень интересный результат, который можно в дальнейшем использовать, например, для выведения линии миобластов с увеличенной экспрессией *DUX4*, причём эндогенной, в отличие от плазмидных систем. Высокая экспрессия гена *DUX4* в модельных клеточных линиях может помочь лучше изучить сам этот ген, его транскрипционные изоформы и варианты белка. В конечном итоге высокий уровень понимания механизма патогенеза МЛД должен привести к созданию эффективной и специфичной терапии.

Литература/References

1. Mostacciuolo, M.L., et al., *Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample*. Clin Genet, 2009. 75(6): p. 550-5.
2. Geng, L.N., et al., *DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy*. Dev Cell, 2012. 22(1): p. 38-51.
3. Vanderplanck, C., et al., *The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression*. PLoS One, 2011. 6(10): p. e26820.
4. Snider, L., et al., *Facioscapulohumeral Dystrophy: Incomplete Suppression of a Retrotransposed Gene*. Plos Genetics, 2010. 6(10).
5. Lemmers, R.J., et al., *Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2*. Nat Genet, 2012. 44(12): p. 1370-4.
6. Wang, L.H. and R. Tawil, *Facioscapulohumeral Dystrophy*. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2016. 16(7).
7. Chen, J.C.J., et al., *Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics*. Molecular Therapy, 2016. 24(8): p. 1405-1411.
8. Sacconi, S., et al., *The FSHD2 Gene SMCHD1 Is a Modifier of Disease Severity in Families Affected by FSHD1*. American Journal of Human Genetics, 2013. 93(4): p. 744-751.
9. van der Maarel, S.M., et al., *De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: Frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10*. American Journal of Human Genetics, 2000. 66(1): p. 26-35.
10. Statland, J., et al., *Results for a dose-escalation phase 2 study to evaluate ACE-083, a local muscle therapeutic, in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neuromuscular Disorders, 2018. 28: p. S140-S140.
11. Pearsall, R., et al., *ACE-083, a locally-acting TGF-beta; superfamily ligand trap, increases muscle mass and strength in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscular Disorders, 2016. 26: p. S129-S129.

12. LoRusso, S., et al., *Clinical trial readiness to solve barriers to drug development in FSHD (ReSolve): protocol of a large, multi-center prospective study*. Neuromuscular Disorders, 2019. 29: p. S54-S54.
13. Passerieux, E., et al., *Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: A double-blind randomized controlled clinical trial*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. 81: p. 158-169.
14. Demirhan, M., et al., *Scapulothoracic Arthrodesis in Facioscapulohumeral Dystrophy with Multifilament Cable*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2009. 467(8): p. 2090-2097.
15. Giannini, S., et al., *Fixation of winged scapula in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Clin Med Res, 2007. 5(3): p. 155-62.
16. Anne-Charlotte Marsollier, L.C., Virginie Mariot, Linda and T.V. Popplewell, George Dickson and Julie Dumonceaux, *Antisense targeting of 30 end elements involved in DUX4 mRNA processing is an efficient therapeutic strategy for facioscapulohumeral dystrophy: a new gene-silencing approach*. Human Molecular Genetics, 2016. 25(8): p. 1468-1478.
17. Wallace, L.M., et al., *Pre-clinical Safety and Off-Target Studies to Support Translation of AAV-Mediated RNAi Therapy for FSHD*. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2018. 8: p. 121-130.
18. Charis L Himeda, T.I.J.a.P.L.J., *CRISPR/dCas9-mediated Transcriptional Inhibition Ameliorates the Epigenetic Dysregulation at D4Z4 and Represses DUX4-fl in FSH Muscular Dystrophy*. Molecular Therapy, 2016. 24(3): p. 527-535.
19. Pandey, S.N., et al., *Morpholino treatment improves muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice*. Mol Ther, 2014. 22(2): p. 390-396.
20. Bortolanza, S., et al., *AAV6-mediated systemic shRNA delivery reverses disease in a mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Mol Ther, 2011. 19(11): p. 2055-64.
21. Lim, J.W., et al., *DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD*. Hum Mol Genet, 2015. 24(17): p. 4817-28.
22. Mamchaoui, K., et al., *Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders*. Skelet Muscle, 2011. 1: p. 34.
23. Zhu, C.H., et al., *Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies*. Aging Cell, 2007. 6(4): p. 515-23.
24. Tsumagari, K., et al., *Gene expression during normal and FSHD myogenesis*. BMC Med Genomics, 2011. 4: p. 67.
25. Lagana, A., et al., *Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation*. Methods Mol Biol, 2015. 1269: p. 393-412.
26. Alam, M.R., et al., *Mitochondrial Ca²⁺ uptake 1 (MICU1) and mitochondrial ca²⁺ uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2012. 287(41): p. 34445-54.
27. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
28. Krivosheeva, I.A., et al., *Analysis of candidate genes expected to be essential for melanoma surviving*. Cancer Cell Int, 2020. 20: p. 488.
29. Barro, M., et al., *Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects*. J Cell Mol Med, 2010. 14(1-2): p. 275-89.
30. Vanderplanck, C., et al., *Overexpression of the double homeodomain protein DUX4c interferes with myofibrillogenesis and induces clustering of myonuclei*. Skelet Muscle, 2018. 8(1): p. 2.
31. Tassin, A., et al., *DUX4 expression in FSHD muscle cells: how could such a rare protein cause a myopathy?* J Cell Mol Med, 2013. 17(1): p. 76-89.
32. Sparber, P., et al., *Various haploinsufficiency mechanisms in Pitt-Hopkins syndrome*. Eur J Med Genet, 2020. 63(12): p. 104088.
33. Fan, M., et al., *Optimizations of siRNA design for the activation of gene transcription by targeting the TATA-box motif*. PLoS One, 2014. 9(9): p. e108253.