

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктор философии (PhD)
по специальности 6D060700 - «Биология»

Соискатель: Алжанұлы Бахытжан

Тема диссертации: «Разработка подходов клеточной терапии диабета путем регуляции синтеза инсулина в β -клетках»

Общее описание исследования. Данная работа посвящена изучению возможности модуляции экспрессии гена инсулина в эмбриональных стволовых клетках с применением технологии CRISPR. В ходе работы была проведена *in vitro* дифференциация редактированных этим методом стволовых клеток в инсулин синтезирующие β -клетки поджелудочной железы.

Актуальность исследования. Сахарный диабет (СД) является хроническим метаболическим заболеванием с тяжелым бременем для мировой системы здравоохранения. Болезнь характеризуется повышенным уровнем сахара в крови (гипергликемия), которое развивается либо из-за полного отсутствия инсулина (СД 1 типа), либо по причине состояния «инсулинорезистентность» или недостаточности инсулина (СД 2 типа).

СД 1 типа появляется вследствие уничтожения β -клеток поджелудочной железы собственной иммунной системой организма, причина которого в науке до сих пор остается неизвестной. Панкреатические β -клетки синтезируют инсулин, один из важнейших гормонов для жизни. На сегодня единственным способом управления данной болезнью является получение инсулина извне, что позволяет искусственно поддержать жизнь больного. В случае не получения препарата инсулина, уровень сахара в крови будет повышаться, вызывая ряд негативных последствий, включая летальный исход.

В качестве решения проблемы СД 1 типа на практике, в мире используется метод пересадки островков Лангерганса, а также самой поджелудочной железы. Однако в обоих случаях нехватка доноров является острой проблемой. В этой связи, пересадка пациенту здоровых и инсулин-синтезирующих β -клеток оценивается как наиболее приемлемое решение. Ведь использование эмбриональных стволовых клеток, как первоисточника всех типов клеток в человеческом организме, может помочь в решении проблемы и СД 1 типа. А применение последних достижений геномного редактирования, например технология CRISPR, повышает возможность создать клетки с улучшенными и подходящими для пересадки качествами.

Цель исследования. Целью работы является разработка генетического подхода на основе технологии CRISPR для модуляции экспрессии гена инсулина в эмбриональных стволовых клетках человека линии H1 и получение новой линии инсулин-синтезирующих β -клеток из модифицированных методом CRISPR H1 клеток путем направленной *in vitro* дифференциации.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1) Разработка лентивирусного вектора с геном репортерного белка

dsRED и 2 гидовыми РНК, комплементарные промотору гена инсулина;

2) Получение двух отдельных плазмид, в которых dCas9 соответственно связан с синтетическим активатором транскрипции (VP64) и репрессором (KRAB) для регуляции транскрипции инсулина;

3) Проверка эффективности плазмидов и лентивектора в человеческих клетках НЕК 293 путем определения экспрессии инсулина. Оптимизация последовательностей конструкций при необходимости;

4) Введение конструкции CRISPR-dCas9-VP64 и лентивирусного вектора в стволовые клетки линии Н1 и определение их эффективности;

5) *In vitro* дифференциация Н1 клеток в инсулин-синтезирующие β -клетки поджелудочной железы;

6) Изучение свойств полученных клеток и определение их чувствительности к глюкозе.

Объекты и материалы исследования. НЕК 293 клетки, НЕК 293Т клетки, Н1 линия эмбриональных стволовых клеток, лентивирус, мышинные клетки Min6, островки Лангерганс поджелудочной железы человека.

Методы исследования. Культура клеток, бактериальная культура клеток, разработка дизайна синтетической гидовой РНК (гРНК), метод анализа Surveyor, разработка конструкций для CRISPR редактирования, молекулярное клонирование фрагментов в конструкции, трансдукция, трансфекция, сортировка клеток по маркерам, выделение РНК, синтез кДНК, количественная ПЦР, электрофорез в агарозном геле, иммуно-окрашивание, направленная *in vitro* дифференциация стволовых клеток в β -клетки поджелудочной железы, статистическая обработка данных.

Научная новизна исследования.

Созданы дизайны нескольких гидовых РНК для нацеливания CRISPR комплекса к промотору гена инсулина. Протестированы и выбраны 2 наиболее эффективных гРНК из созданной библиотеки. Создан новый лентивирусный вектор для доставки гРНК в клетки-мишени.

Получены и протестированы плазмиды с неактивированной нуклеазой dCas9 и активатором транскрипции VP64, а также dCas9 с репрессором транскрипции KRAB, dCas9-VP64 и dCas9-KRAB, соответственно. Получены линии НЕК 293 клеток, стабильно экспрессирующие эти белки.

Протестирована эффективность разработанного комплекса CRISPR (dCas9 нуклеаза, гРНК, регулятор транскрипции) в НЕК 293 клетках путем трансдукции лентивектором ранее полученных dCas9-VP64 НЕК 293 клеток. Показано, что разработанный подход способен активировать экспрессию инсулина в этих клетках. Более того, трансфекция этих же клеток плазмидой dCas9-KRAB привела к снижению ранее повышенной экспрессии инсулина.

Конструкции, в частности плазмиды CRISPR-dCas9 и лентивирусный вектор, успешно внедрены в стволовые клетки Н1, что было подтверждено повышенными экспрессиями всех ключевых генов каждой конструкции и также повышением экспрессии инсулина в клетках Н1.

Проведена направленная *in vitro* дифференциация отредактированных стволовых клеток Н1 в инсулин-синтезирующие β -клетки, используя

доступные на момент исследования протоколы. По итогам дифференциации получена линия клеток, экспрессирующие ключевые маркеры естественных β -клеток такие как NKX 6.1, MAFA и инсулин. Подтверждены статистически значимые уровни экспрессии каждого гена. В полученных клетках показана значимая повышенная экспрессия гормона инсулина по сравнению с экспрессиями соматостатина и глюкагона.

Экспериментально выявлено, что β -клетки, полученные от стволовых клеток H1, которые редактированы методом CRISPR, имеют более высокую экспрессию инсулина по сравнению с β -клетками, полученными от обычных H1 клеток. Это показывает, что применение технологии CRISPR в модуляции эндогенного инсулина в стволовых клетках положительно отражается на уровне экспрессии гормона в итоговых β -клетках.

Таким образом, экспериментально показана возможность регуляции транскрипции инсулина методом CRISPR-dCas9 сначала в человеческих клетках HEK 293, далее в эмбриональных стволовых клетках линии H1. А также показано, что генетически редактированные клетки H1 могут быть успешно дифференцированы до β -клеток поджелудочной железы, при этом не теряя способность экспрессировать ключевые гены CRISPR комплекса.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В ходе исследования были получены новые фундаментальные знания по клеточной биологии HEK 293 клеток человека, а также о биологии стволовых клеток линии H1, что имеет существенные теоретические знания в дальнейшем понимании их свойств в исследованиях с применением технологии геномного редактирования и синтетических транскрипционных факторов. С практической точки зрения исследование показало возможность применения подхода клеточной терапии для сахарного диабета I типа, основываясь на технологию геномного редактирования CRISPR. Стоит отметить, что инъекция экзогенного инсулина приводит к долгосрочным осложнениям. Поэтому сотни исследовательских групп по всему миру отчаянно пытаются найти новые и более эффективные способы управления и лечения СД I типа. В этой связи, результаты, полученные в ходе данной работы послужат новым знанием в этом направлении.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гидовые РНК инсулина можно сконструировать и, соответственно, упаковать в вектор на основе лентивируса для последующего использования в регуляции экспрессии инсулина методом CRISPR;

2. Синтетические факторы транскрипции можно синтетически связать с деактивированной нуклеазой Cas9 в составе плазмиды. Такая связь позволяет регулятору транскрипции взаимодействовать с последовательностью-мишенью в результате связывания dCas9 нуклеазы с гРНК. При введении в клетки-хозяева активатор транскрипции VP64 и репрессор домен KRAB соответственно либо усиливает или подавляют транскрипцию;

3. Комплекс CRISPR, состоящий из плазмиды CRISPR-dCas9-VP64 и лентивектора с гРНК инсулина, способен активировать экспрессию инсулина в клетках HEK 293 человека. А добавление плазмиды dCas9-KRAB в эти же

модифицированные клетки вызывает конкуренцию между нуклеазами dCas9 доменов VP64 и KRAB за взаимодействие со свободными гРНК и в итоге приводит к некоторому снижению уровня экспрессии инсулина;

4. Разработанный подход на основе CRISPR для регуляции экспрессии инсулина показывает эффективность в эмбриональных стволовых клетках H1, аналогичную при использовании с обычными клетками HEK 293 человека. Между тем, те клетки H1, в которых отсутствует инсулиновые гРНК, соответственно, не показывают повышение уровня экспрессии целевого продукта, указывая на решающую роль гРНК в редактировании CRISPR;

5. Направленная *in vitro* дифференциация отредактированных методом CRISPR стволовых клеток H1 в β -клетки поджелудочной железы предоставляет возможность получить новую линию клеток, синтезирующих инсулин. Полученные клетки способны экспрессировать больше инсулина по сравнению β -клетки, полученные из обычных H1 клеток, но ожидаемо меньше инсулина по сравнению с естественными островковыми клетками;

6. Полученные инсулин синтезирующие клетки менее чувствительны к изменениям концентрации глюкозы в среде по сравнению с естественными островковыми клетками.

Основные результаты и выводы:

1. Разработан и получен лентивирусный вектор, содержащий репортерный ген dsRED и две гидовые РНК, комплементарные промотору инсулина;

2. Получены линии клеток HEK 293, стабильно экспрессирующие гены dCas9-VP64 и dCas9-KRAB;

3. Экспериментально показано, что синтетические факторы транскрипции способны активировать (VP64, nearly 900x), а также снижать (KRAB, roughly 600x) экспрессию эндогенного инсулина в клетках HEK 293 при использовании вместе с гРНК и нуклеазой dCas9;

4. Полученный комплекс CRISPR показал способность повысить экспрессию инсулина в стволовых клетках линии H1 (around 900x);

5. Экспериментально показана возможность получения инсулин-продуцирующих β -клеток из отредактированных методом CRISPR стволовых клеток H1 путем направленной дифференциации *in vitro*. Обнаружено, что процесс дифференциации ожидаемо влияет на эффективность генов конструкции CRISPR в полученных β -клетках, но при этом сохраняется вполне определяемая экспрессия инсулина.

6. Определено, что полученные инсулин синтезирующие клетки менее чувствительны к изменениям концентрации глюкозы в среде по сравнению с естественными островковыми клетками.

Связь диссертации с научным проектом.

Работа была выполнена в лаборатории структурной и функциональной геномики Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина. Исследование было частично поддержано за счет средств грантового проекта AP08857430 «Идентификация нового малоинвазивного биомаркера для диагностики и прогнозирования диабетической ретинопатии

на основе микроРНК» в рамках конкурса Комитета науки МНВО РК. Часть исследования была проведена в Центре по изучению сахарного диабета при Университете Британской Колумбии (Ванкувер, Канада) в рамках финансирования от Фонда по изучению детского диабета (Juvenile Diabetes Research Foundation - JDRF, в настоящее время – «Breakthrough T1D»).

Вклад автора в результаты, описанные в диссертации. Соискатель самостоятельно выполнил все эксперименты, описанные в данной работе. Большинство методов описанные в работе были разработаны ранее другими учеными, а некоторые современные методы, такие как дифференциация стволовых клеток в инсулин-продуцирующие клетки и протокол иммуноокрашивания, принадлежат Центру изучения диабета при Университете Британской Колумбии. Кандидат самостоятельно провел анализы полученных результатов, составил рисунки, провел поиск литературы и собственноручно написал данную диссертацию.

Апробация исследования. Результаты исследования были представлены на следующих национальных и международных конференциях в Казахстане и за рубежом: V международные фарабиевские чтения, 2018 г., Алматы, Казахстан; конференция «International Trends in Science and Technology», 2018 г., Варшава, Польша; международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии и биохимии» посвященная к 80-летию академика М.А.Айтхожина, 2019 г., Алматы, Казахстан; международная научная конференция молодых ученых «Фараби Әлемі», 2019 г., Алматы, Казахстан; VI международный конгресс молодых ученых, 2019 г., Алматы, Казахстан; международная научно-практическая конференция «Глобальные тенденции развития современного здравоохранения», посвященная 80-летию А.Д.Дуйсекеева, 8-9 декабря 2022 г., Алматы, Казахстан; конференция «Advanced Technologies and Treatments for Diabetes», 2023 г., Берлин, Германия; I международный форум «Asfen.Forum, новое поколение – 2023», 2023 г., Алматы, Казахстан; международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в области молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии», посвященная 40-летию со дня основания Института молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина, 2023 г., Алматы, Казахстан.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 13 печатных работах, в том числе в виде 2 статей и 1 тезиса в зарубежных журналах с ненулевым импакт-фактором входящих в базу данных Web of Science и/или Scopus, 3 статей в республиканских научных изданиях (из них 2 из списка КОКНВО МНВО РК), а также в виде 1 статьи и 6 тезисов в материалах международных научно-практических конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 90 страницах, состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников литературы из 169 наименований, а также содержит 32 рисунков.