

О.Г. Губина – студент

А.Д. Балданшириева – ординатор

Л.А. Смышляева – кандидат химических наук

В.Л. Русинов – доктор химических наук, профессор

М.В. Вараксин – кандидат химических наук, доцент

О.Г. Makeev – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

O.G. Gubina – student

A.D. Baldanshirieva – postgraduate student

L.A. Smyshlyeva – Candidate of Sciences (Chemistry)

V.L. Rusinov – Doctor of Science (Chemistry), Professor

M.V. Varaksin – Candidate of Sciences (Chemistry), Docent

O.G. Makeev – Doctor of Science (Medicine), Professor

УДК: 577.218

РАЗРАБОТКА ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МЕТОДА КОРРЕКЦИИ ДЕРМАТИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Мария Анатольевна Десятова¹, Александр Игоревич Пономарев², Всеволод Викторович Мелехин³, Артем Владимирович Коротков⁴, Олег Германович Makeev⁵

¹⁻⁵ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

¹⁻⁵ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

³ЛПБКиГТ, ИЦ ХФТ ХТИ ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

¹mardesyatova@yandex.ru

Аннотация

Введение. Ген Klotho способствует подавлению возрастных изменений и обладает противовоспалительным действием при наличии его экспрессии. Поэтому может быть использован в качестве альтернативного подхода предупреждения и лечения атопического дерматита (АД) на молекулярном уровне. Современные терапевтические подходы, сосредоточенные на поверхностном воздействии на пораженные участки кожи и противовоспалительной терапии не всегда эффективны. В настоящем исследовании мы разработали новый подход, который с помощью экзосом, сверхэкспрессирующих Klotho, потенциально позволит обратить вспять апоптоз и предупредить АД. **Цель исследования** - разработка метода таргетной доставки для коррекции нарушений барьеров кожи с применением ранее разработанного алгоритма, позволяющего вызвать гиперэкспрессию Klotho в клетках- мишенях. **Материалы и методы.** Проведена постановка методики, позволяющей вызывать гиперэкспрессию гена Klotho путем адаптации уже отработанной нами ранее технологии трансфекции целевых клеток с использованием генного конструкта, несущего дополнительные копии данного

гена. **Результаты и обсуждение.** Результатом настоящей работы стал отработанный алгоритм получения, наработки и таргетной доставки потенциального терапевтического агента – плазмид, несущих в качестве полезного гена - гена Klotho с помощью экзосом. Оценка гиперэкспрессии гена Klotho была проведена посредством ПЦР в реальном времени. Экзосомы, несущие полезный ген позволяют оказывать терапевтический эффект на различных стадиях развития АД. Данная методология является универсальной и может быть реализована исходя из нужд определенной лаборатории. **Выводы.** В заключение следует отметить, что экзосомальная терапия с Klotho является потенциальным терапевтическим агентом для клинических вмешательств при дерматитах различного генеза.

Ключевые слова: ген Клото, экспрессия, трансфекция, полимеразная цепная реакция (ПЦР), экзосомы, воспаление

DEVELOPMENT OF POTENTIAL THERAPEUTIC APPROACH FOR CORRECTION OF DERMATITIS OF DIFFERENT NATURE

Mariya A. Desyatova¹, Alexander I. Ponomarev², Vsevolod V. Melekhin³, Artem V. Korotkov⁴, Oleg G. Makeev⁵

¹⁻⁵Ural state medical university, Yekaterinburg, Russia

¹⁻⁵Institute of Medical Cellular Technologies, Yekaterinburg, Russia

³Innovation Center of the Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Technology, Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

¹mardesyatova@yandex.ru

Abstract

Introduction. The Klotho gene contributes to the suppression of age-related changes and has anti-inflammatory effects induced by overexpression. Therefore, it could be used as an alternative approach to prevent and treat atopic dermatitis (AD) at the molecular level. Current therapeutic approaches focusing on superficial treatment of affected skin areas are not fully effective. In the present study, we have developed a novel approach that will potentially reverse apoptosis and prevent AD using exosomes overexpressing Klotho. **The aim of this study-** to develop a targeted delivery method for correction of skin barrier disorders using an adapted algorithm to recruit additional copies of the Klotho gene into target cells and a method to validate its overexpression. **Materials and methods.** A methodology was staged to induce overexpression of Klotho gene by adapting a previously developed technology of PCR product ligation into an empty vector and transforming cell lines by incorporating a plasmid with ligated PCR product into bacterial cells (E.Coli.). **Results and discussion.** The present work has resulted in a well-established algorithm for the production, generation and targeting of potential therapeutic agent, Klotho gene, by using exosomes. The overexpression of the Klotho gene was assessed by real-time PCR. This algorithm can be applied to both naturally and artificially induced overexpression of the Klotho gene. Exosomes carrying the beneficial gene will allow for therapeutic effects at different stages of AD. This methodology is versatile and can be implemented according to the needs of a

particular laboratory. **Conclusions.** In conclusion, exosomal therapy with Klotho is a potential therapeutic agent for clinical interventions for dermatitis of different genesis.

Keywords: Klotho gene, expression, transfection, polymerase chain reaction (PCR), exosomes, inflammation.

ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит (АД) — это воспалительное заболевание кожи, которым страдает до 20% педиатрического населения во всем мире. У пациентов с АД обычно наблюдается сухость кожи и зуд, а также повышенный риск развития астмы и аллергического ринита. АД, как известно, имеет сильный генетический компонент с предполагаемой наследуемостью более 60% [1]. Варианты потери функции филаггрина являются наиболее наблюдаемым генетическим фактором риска среди свыше 40 генов, связанных с предрасположенностью к АД [1,2]. Функции генома человека изменяются на протяжении жизни под воздействием внешних факторов. При этом внешние факторы изменяют экспрессию генов, не влияя на заключенную в них информацию – эпигенетические перестройки [2,3].

Барьерную функцию кожи обеспечивают ороговевшие клетки верхнего слоя эпидермиса (кератиноциты) и водно-липидная мантия, покрывающая его поверхность. В норме кератиноциты связаны между собой десмосомами, обеспечивающими целостность эпидермиса и предохраняющими глуболежащие слои от высыхания. Благодаря высокому содержанию в эпидермисе липидов через него проникают жирорастворимые вещества, а для воды и водных растворов он практически непроницаем. Водно-липидная мантия имеет кислую реакцию, что ослабляет или нейтрализует действие многих агрессивных факторов и препятствует проникновению в кожу патогенных микроорганизмов. Повреждение липидной структуры рогового слоя и истончение водно-липидной пленки — основной дефект кожи при атопическом дерматите, обуславливающий ее повышенную проницаемость для аллергенов и раздражителей может быть обусловлен в том числе генетическими факторами.

Это послужило поводом для дальнейшего изучения патогенеза заболевания и разработке нового таргетного подхода к коррекции и предупреждению АД посредством использования секреторируемой формы Klotho.

Мы задаемся целью подтвердить гипотезу о том, что Klotho оказывает благотворное влияние на дерматиты различного генеза путем снижения апоптоза и воспаления [3-6].

Экзосомы - небольшие мембранные везикулы, образующиеся в результате слияния мультивезикулярных лизосом с плазматическими мембранами и внеклеточного высвобождения интралюминальных везикул [4, 5].

Экзосомы, высвобожденные из мезенхимальных мультипотентных стромальных стволовых клеток (ММСК),

проявляют противовоспалительный и способны восстанавливать повреждения кожи.

В основе АД заложены генетические и эпигенетические изменения, которые возможно корректировать и предупреждать.

Поэтому применение экзосом для секреции Klotho может стать потенциальным противовоспалительным агентом в терапии АД.

Цель исследования - разработка метода таргетной доставки полезного гена для коррекции нарушений барьеров кожи с применением адаптированного алгоритма по наработке дополнительных копий гена Klotho в клетки-мишень и метода валидации гиперэкспрессии

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экзосом

Задачей данного исследования является повышение качества лечения повреждений кожи. Задача решается путем изменения общей схемы применения клеточного материала – использование не цельных клеток, а секретлируемых данными клетками экзосом. Экзосомы являются важными посредниками физиологической межклеточной коммуникации. Физиология экзосомального транспорта предоставляет возможность организации таргетной доставки лекарственных средств к клеткам-мишеням, что позволяет реализовать новый способ терапии во многих терапевтических областях. Последнее может быть реализовано за счет возможности экзосом включать биологически активную полезную нагрузку в своё внутреннее содержимое посредством избыточной экспрессии генов, ответственных за синтез необходимых веществ в клетке-производителе. Так, с целью повышения регенераторного потенциала фибробласты человека в процессе культивирования трансфецируют генетическими плазмидными векторами, обеспечивающими эктопическую экспрессию генов Klothosecreted (Addgene plasmid 17713). Первичную культуру клеток получают из биоптата пациента, взятого под местной анестезией с ягодичной области самого пациента.

Генетические конструкции

Плазмиды выделяли из трансгенной линии E.coli с применением торгового набора MiniprepKit (D4015, ZymoResearch, USA) в соответствии с протоколом производителя. Для этого 5 мл бактериальной культуры, выращенной в жидкой LB-среде (SigmaAldrich, USA) с добавлением селективного антибиотика ампициллина 75 мкг/мл (SigmaAldrich, USA), центрифугировали при 200 g 10 минут. Осадок ресуспендировали в буфере. Затем лизировали бактерии в буфере и центрифугировали при 15000 g 3 минуты. Из супернатанта выделяли плазмидную ДНК с помощью колонок и очищали промывочным буфером из набора MiniprepKit.

Количественный и качественный анализ плазмидной ДНК и оценка уровня экспрессии.

Выделенную плазмидную ДНК разводили в промывочном буфере (Miniprep). Количественный подсчет проводили на спектрофотометре (BIO-RAD) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили при длине

волны 280 нм с последующей оценкой соотношения A260/A280. Образцы считали пригодными при $A260/A280 = 1.8 \pm 0.05$. Копийность полученных растворов плазмидной ДНК находили по формуле: (количество ДНК (нг) * $6,022 \times 10^{23}$) / (длина плазмиды (п.о.) * $1 \times 10^9 * 650$). Для последующих ПЦР в качественном и количественном форматах готовили серию разведений с известной копийностью в 1 мкл раствора: $3 * 10^5$, $3 * 10^4$, $3 * 10^3$.

ПЦР – идентификация полезного гена

Для идентификации нуклеотидной последовательности выделенных плазмид использовали праймеры к участкам, лежащим в пределах первых двух экзонов гена Клото: KL (forward), CACAACCTCCTCCTGGCTCAT и KL (reverse), TCCAGTGAGAGCTTAGGGCA. Использовали следующие параметры термоциклирования: 95°C 2 минуты и далее 35 циклов: 95°C 15 секунд, 62°C 15 секунд и финальную элонгацию при 72°C в течение 7 минут.

ПААГ электрофорез, вырезание и элюирование продуктов ПЦР

ПЦР продукты, полученные в ходе реакции, разделяли в 6% полиакриламидном геле (BIO-RAD) с помощью вертикального электрофореза с использованием камеры (BIO-RAD) при постоянном напряжении 150 Вв течение 45 минут. В качестве маркера длин фрагментов использовали молекулярную линейку DNA lowrangeladder (Fermentas) с шагом фрагментов в 25 п.о. Окрашивали 1% бромистым этидием и визуализировали в УФ-излучении. Оценивали специфичность реакции по отсутствию фрагментов длины отличной от 103 п.о. Вырезали фрагменты нужного размера с помощью скальпеля и помещали в 40 мкл ddH₂O на сутки с целью элюции продукта из геля.

Секвенирование

Для верификации полученных результатов проводили секвенирование по Сенгеру. Анализ и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы SequencingAnalysis (AppliedBiosystems). Полученные консенсусные последовательности сравнивали с референсными с помощью базы данных BLAST (ncbi).

Культура клеток и трансфекция

ММСК культивировали в среде ДульбекоF-12(Sigma), содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Клетки, по достижению логарифмической фазы роста (8×10^5 клеток/мл), трансфецировали посредством Escort III (SigmaAldrich, USA) в соответствии с протоколом производителя. В заранее подготовленные культуры клеток добавляли ДНК-липидные комплексы, инкубировали 16 часов и меняли среду на стандартную ростовую.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Трансфецированные культуры трижды отмывали раствором PBS и снимали с матрасов. Тотальную РНК выделяли с помощью TrizolTriReagent (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя. Затем изоляты РНК преобразовывали в кДНК с помощью набора реагентов для обратной транскрипции (Fermentas, США). ДНК амплифицировали с помощью набора SYBR Green PCR (Thermo, США). Для регистрации наработки продукта

амплификации использовали систему детекции Real-Time PCR Roche-Lightcycler. Последовательности праймеров были следующими: Klotho (прямой: 5' TCCCTCCTTTACCTGAGAAC 3'; обратный: 5' CGGATGGCAGAGAGAAATCAAC 3') и GAPDH (прямой: 5' GGAGTCTACTGGCGT-CTTCAC 3'; обратный: 5' ATGAGCCCTTCCACGAT-GC 3').

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получена культура клеток гиперэкспрессирующая ген Klotho. Везикулы, секретируемые данными клетками содержат в большом количестве белки семейства Klotho. Повышение экспрессии гена регистрировали методом Real-time PCR. При этом оценивали экспрессию гена Klotho по количеству копий информационной РНК в сравнении с количеством копий гена домашнего хозяйства GAPDH. В контрольной группе количество РНК-копий klotho примерно в 25 раз превышало количество копий гена GAPDH.

ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм таргетной доставки полезного гена в клетки-мишень на примере гена Klotho.
2. Состав экзосом, имеющих цитоплазматическое происхождение, может дополняться биологически активными молекулами и генами и таким образом служить для коррекции эпигенетического ландшафта клеток.
3. Разработанный протокол обеспечивает перспективность применения экзосом в качестве средства доставки биологически активных веществ в целевые клетки и может быть адаптирован для применения других полезных генов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Watson W., Kapur S. Atopic dermatitis. Allergy. Asthma. Clin. Immunol. – 2021; 7(1): 171-178.
2. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. / Hu M.C, Shi M, Zhang J, et al. // The FASEB Journal. - 2010; 24(9): 3438–3450.
3. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. / Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., et al. // Science. – 2005; 309 (5742): 1829–1833.
4. Selective inhibition of NF-κB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. / Ethridge R.T., Hashimoto K., Dai H.C. et al. // Journal of the American College of Surgeons. - 2020; 195(4): 497-505.
5. The anti-aging protein Klotho is induced by GABA therapy and exerts protective and stimulatory effects on pancreatic beta cells. / Prud'homme G.J., Glinka Y., Kurt M. et al. // Biochemical and biophysical research communications. - 2017; 493(4): 1542-1547.

УДК: 616-056.71