

УДК 577.21

ЭФФЕКТИВНАЯ ВИРУСНАЯ ДОСТАВКА В НЕЙРОНАЛЬНУЮ КУЛЬТУРУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

© 2022 г. Е. А. Лунев^{a, b, c}, А. А. Шмидт^a, С. Г. Васильева^a, И. М. Савченко^a, В. А. Логинов^a, В. И. Марина^b, Т. В. Егорова^a, М. В. Бардина^{a, b, c, *}

^aИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bООО “Марлин Биотех”, Сочи, 354340 Россия

^cЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: maryana.bardina@gmail.com

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

GNAO1-энцефалопатия – орфанное генетическое заболевание, которое характеризуется ранней младенческой эпилепсией, нарушением контроля над движениями и серьезной задержкой развития. Заболевание вызывается мутациями в гене *GNAO1*, приводящими к нарушению функций кодируемого этим геном белка Gαo1. Методы лечения GNAO1-энцефалопатии отсутствуют, а симптоматическая терапия неэффективна. Фенотипическая гетерогенность заболевания указывает на необходимость персонализированного подхода к разработке терапии пациентов с конкретным патогенным вариантом *GNAO1*, что требует изучения механизма заболевания на животных и клеточных моделях. В настоящей работе разработан подход к созданию клеточных моделей GNAO1-энцефалопатии на первичной культуре нейронов здоровой мыши, а также к тестированию препаратов генной терапии *in vitro*. С этой целью нами оптимизирована доставка трансгенов в Gαo1-экспрессирующие клетки с помощью аденоассоциированных вирусов (AAB). Оценен тропизм пяти нейротропных серотипов AAB (1, 2, 6, 9, DJ) к Gαo1-позитивным нейронам в культуре из цельного мозга мыши. Самый высокий потенциал в качестве средства доставки репортера показал серотип DJ, который заражал до 66% целевых нейронов без выраженной цитотоксичности. AAB-DJ также обеспечивал эффективную доставку и экспрессию генетических конструкций, кодирующих нормальную и мутантную форму Gαo1, а также коротких шпилечных РНК (shРНК) для супрессии эндогенного *Gnao1* в нейронах мыши. Полученные нами результаты позволят продвинуться в изучении механизма патогенеза клинических вариантов GNAO1-энцефалопатии, а также тестировать конструкции для генной терапии данного заболевания в клеточных моделях.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы, орфанные заболевания, GNAO1-энцефалопатия, Gαo1, вирусная доставка, *in vitro* моделирование заболеваний человека, генная терапия, персонализированная медицина, первичная нейрональная культура, короткие шпилечные РНК

DOI: 10.31857/S0026898422040061

ВВЕДЕНИЕ

Использование технологий высокопроизводительного секвенирования позволило обнаружить связь между мутациями в гене *GNAO1* и орфанным неврологическим расстройством – GNAO1-энцефалопатией [1, 2]. Это генетическое заболевание проявляется в младенчестве и характеризуется эпилептической энцефалопатией (OMIM 615473) и/или нарушением развития мозга с непроизвольными движениями (OMIM 617493). Ген

GNAO1 экспрессируется преимущественно в головном мозге и кодирует белок Gαo1 [3, 4]. Функция белка Gαo1 слабо изучена, однако известно, что Gαo1 относится к семейству ингибиторных G-белков (Gi/o) и участвует в модуляции сигналинга в нейронах [5]. Описано 25 клинически значимых мутаций гена *GNAO1* [5], все они проявляются в гетерозиготном состоянии и возникают *de novo*.

Сокращения: AAB – аденоассоциированные вирусы; ITR – Inverted terminal repeats (концевые инвертированные повторы); LOF – Loss-of-function (потеря функции); GOF – Gain-of-function (усиление функции); ГК – геномные копии.

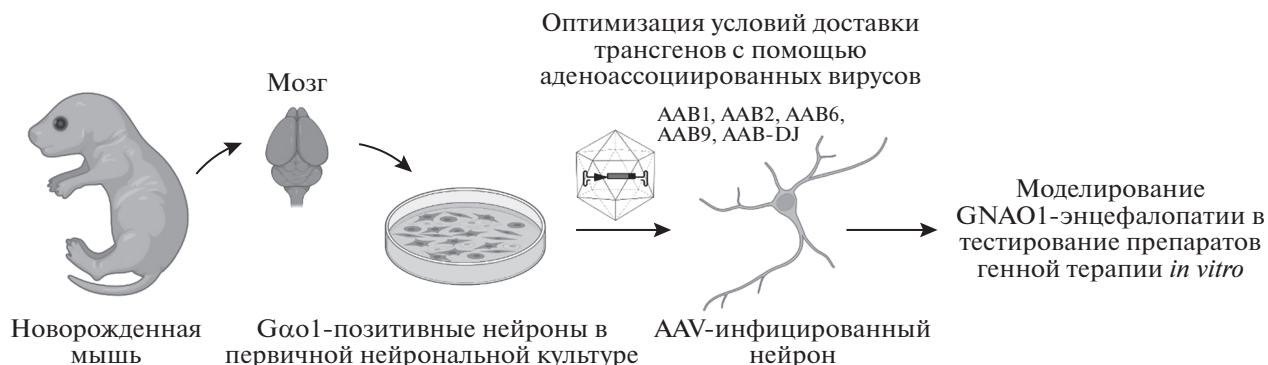


Рис. 1. Общая схема применения AAV-опосредованной доставки трансгенов в первичную культуру нейронов мыши для моделирования и тестирования препаратов генной терапии для GNAO1-энцефалопатии.

Способов лечения GNAO1-энцефалопатии не существует. Симптоматическая терапия включает антиконвульсанты и препараты для снятия гиперкинеза, однако они проявляют высокую эффективность не у всех пациентов [6, 7]. Ситуация осложняется фенотипической гетерогенностью заболевания, вызванной разным влиянием конкретных мутаций на функцию Gα1 и опосредованную им нейрональную передачу. Так, описана группа мутаций *GNAO1* (D174G, I279N, G40R), которые проявляются преимущественно младенческой эпилепсией; другая группа мутаций (E246K, R209H, R209C, R209G) приводит к нарушению двигательной активности [8–11]. Вероятно, эпилепсия развивается в результате мутаций, приводящих к дефициту белка Gα1 (так называемые LOF-мутации, от англ. *loss-of-function*), а двигательные нарушения, напротив, ассоциированы с мутациями, усиливающими функцию Gα1 (GOF-мутации, от англ. *gain-of-function*) [12]. Примечательно, что наиболее часто встречающийся вариант *GNAO1* с.607 G>A (p.G203R) приводит к развитию двойного фенотипа, т.е. у пациентов развиваются как эпилепсия, так и двигательные нарушения [13]. Фенотипическую гетерогенность необходимо принимать во внимание при подборе схемы терапии и применять персонализированный подход с учетом конкретного патогенного варианта *GNAO1* и молекулярного механизма заболевания.

Патогенез GNAO1-энцефалопатии и ее отдельных вариантов необходимо детально изучать на животных и клеточных моделях. Однако создание персонализированных животных моделей в случае таких ультраредких заболеваний, как GNAO1-энцефалопатия (около 200 случаев в мире по данным <https://gnao1.org/>), является трудозатратным, а материал для получения пациент-специфических нейронов не всегда доступен. Альтернативой клеточной модели GNAO1-энцефалопатии могут служить нейроны здоровых мышей с доставкой в них трансгенов с помощью рекомбинантных аденоассоциированных вирусов

(AAV) (рис. 1). AAV представляют собой эффективный инструмент для доставки генов в нейрональные клетки [14, 15]. Разнообразие доступных природных, рекомбинантных и синтетических серотипов позволяет трансдуцировать разные субпопуляции нейронов [15–17]. Для создания модели GNAO1-энцефалопатии с LOF-мутациями можно доставлять в нейроны мыши короткие шпилечные РНК (shРНК). Специфичные shРНК будут подавлять экспрессию эндогенного *Gnao1* по механизму РНК-интерференции, воспроизводя дефицит нормального белка Gα1. Патологию GNAO1-энцефалопатии с GOF- или доминантно-негативными мутациями (нарушающими функцию нормального белка) можно смоделировать, доставляя с помощью нейротропных AAV белкодирующую последовательность мутантного гена.

Рекомбинантные AAV часто используются в качестве векторов при разработке генотерапевтических препаратов [18]. Высокая способность к трансдукции нейронов, низкая токсичность и иммуногенность позволяют использовать рекомбинантные AAV в генной терапии заболеваний центральной нервной системы [19]. Генная терапия потенциально применима для коррекции GNAO1-энцефалопатии. Так, пациентам с LOF-мутациями подходит заместительная генная терапия с AAV-опосредованной доставкой функциональной копии гена *GNAO1* для восполнения дефицита белка Gα1. В случае доминантно-негативных и GOF-мутаций можно применить аллель-селективное подавление экспрессии мутантного аллеля или подавление обоих аллелей в комбинации с доставкой нормального гена [20]. Кроме того, AAV могут обеспечить доставку современных инструментов для редактирования нуклеиновых кислот независимо от типа мутации [21]. Первичное тестирование AAV-векторов можно проводить на первичной культуре нейронов мыши (рис. 1).

В настоящей работе мы оптимизировали AAV-опосредованную доставку трансгенов в нейроны мыши *in vitro* для моделирования GNAO1-энце-

фалопатии и скрининга препаратов для генной терапии. На первом этапе мы получили из мозга мышей первичную культуру $G\alpha 1$ -экспрессирующих нейронов. Далее охарактеризовали AAB пяти нейротропных серотипов (1, 2, 6, 9, DJ) с репортерным геном и показали, что AAB-DJ обладает наибольшим тропизмом к $G\alpha 1$ -положительным нейронам при отсутствии выраженной цитотоксичности. Кроме того, нами показано, что AAB-DJ обеспечивает эффективную доставку трансгенного *GNAO1* дикого типа и с мутацией G203R, а также shPHK для супрессии эндогенного *Gnao1* в нейрональной культуре мыши.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Мыши линии CD-1 получены из разведения питомника “Столбовая”, Филиала Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН.

Пациенты. От родителей пациента с вариантом *GNAO1* с.607 G>A получено письменное информированное согласие на проведение биопсии и участие в научных исследованиях.

Клонирование плазмидных конструкций. pAAV-GNAO1-wt-мус и pAAV-GNAO1-G203R-flag. Биоптат кожи пациента с GNAO1-энцефалопатией, вызванной гетерозиготным вариантом *GNAO1* с.607 G>A, предоставлен НИКИ педиатрии им. Ю.Е. Вельтишева. Фибробласты кожи пациента использовали для амплификации белоккодирующей последовательности гена *GNAO1* (CCDS10756.1) дикого типа и с мутацией с.607 G>A (G203R). Ампликоны (1065 п.н.) получали в ПЦР с парой праймеров (5'-ATGGGATGTA CTCTGAGCGCA-3' и 5'-TCAGTACAAGCCG CAGCCC-3') и клонировали в коммерческий вектор pEGFP-C1 (“Clontech”, США) вместо EGFP безлигазным методом. Для этого вектор линейаризовали в ПЦР с праймерами 5'-GGCTGCGGCTTG-TACTGATCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAA-3' и 5'-GCGCTCAGAGTACATCCCATGGTGCG-GACCGGTAGCG-3', сборку проводили на основе перекрывания концевых последовательностей ампликонов с использованием T4 ДНК-полимеразы (“SibEnzyme”, Россия, E339). Полученные плазмиды обозначены pGNAO1 и pGNAO1-G203R.

На следующем этапе CDS *GNAO1* и *GNAO1-G203R* встроили в вектор pAAV-eGFP вместо eGFP с добавлением на С-конец эпитопов мус и flag соответственно (pAAV-GNAO1-wt-мус и pAAV-GNAO1-G203R-flag). С этой целью GNAO1-wt-мус синтезировали на матрице pGNAO1 с использованием пары праймеров GNAO1_F (5'-GAAGTCAACCATGGGATGTA CTCTGAGCGCA-GAGGAG-3') и Mус_R (5'-GATCCTCTTCT-GAGATGAGTTTTTGTTCGTACAAGCCG CAG-

CCCCGGA-3'), вектор pAAV-eGFP готовили для вставки путем амплификации с праймерами GNAO1_R (5'-GTACATCCCATGGTGACTTCTTT-TTTGCTTTAGCAGGCTCTTTC-3') и Mус_F (5'-AAACTCATCTCAGAAAGAGGATCTGTAATA-ATAACCGGGCAGGCCATGTCT-3'). Вставки GNAO1-G203R-flag синтезировали на матрице pGNAO1-G203R с праймерами GNAO1_F и Flag_R (5'-CTTGTTCGTATCGTCTTTGTAGTC-GTACAAGCCG CAGCCCCGGA-3'), вектор готовили с праймерами GNAO1_R и Flag_F (5'-CAAAGACGATGACGACAAGTAATAATAACCG-GGCAGGCCATGTCT-3'). Сборку проводили методом безлигазного клонирования, как описано выше.

Конструкции с shPHK. shPHK для подавления эндогенного транскрипта *Gnao1* (NM_010308.3) подобраны с помощью интернет-портала Genetic Perturbation Platform (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/seq/search>). Из 13 предсказанных shPHK выбрали три перспективные с высоким рейтингом (intrinsic score) для таргетных последовательностей: TRCN0000036487 (5'-CGCTCACCCAA-CAAAGAAATA-3'), TRCN0000097757 (5'-CGCT-CACCCAAACAAAGAAATT-3'); TRCN0000097756 (5'-CGAATAATATCCAGGTGGTAT-3'), далее shGnao1/1, shGnao1/2 и shGnao1/3 соответственно. Плазмида pLKO.1-shGnao1/1 приобретена в составе набора TRC Lentiviral Human Gnao1 shRNA (“Dharmacon”, США, RHS4533-EG2775). shGnao1/2, shGnao1/3, а также shEGFP (таргетная последовательность 5'-TACAACAGCCACAAC-GTCTAT-3') были клонированы в вектор pLKO.1 (Addgene plasmid #10878) [22], любезно предоставленный David Root, по протоколу сайта Addgene [23] с изменениями. Вставки клонировали с использованием пары одноцепочечных олигонуклеотидов (“Евроген”, Россия) с таргетными последовательностями. Пару олигонуклеотидов отжигали в буфере NEBuffer 2 (B7002S) для получения дуплекса с липкими концами для AgeI и EcoRI и фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой (“Sibenzyme”). Вектор линейаризовали и одновременно дефосфорилировали, обрабатывая рестриктазами EcoRI и AgeI (“SibEnzyme”) и щелочной фосфатазой FastAP (“ThermoFisher”, США) в буфере SE Orange (“SibEnzyme”) в течение 2 ч при 37°C, затем выделяли из 0.6%-ного агарозного геля. Лигирование проводили с помощью T4-ДНК-лигазы (“ThermoFisher Scientific”). Все полученные конструкции имели одинаковый дизайн shPHK (стебель 21 п.н. и шестинуклеотидная петля с сайтом рестрикции XhoI) и отличались только таргетными последовательностями. Контрольный вектор pLKO.1-shSCR с нетаргетирующей shPHK любезно предоставлен David Sabatini (Addgene plasmid, #1864).

После функциональной проверки экспрессионные кассеты из pLKO.1-shGnao1/1 и pLKO.1-

shSCR, содержащие U6-промотор, shPHK и терминатор, клонировали в вектор pAAV-eGFP между 5'-ITR и CMV-промотором. Для этого экспрессионную кассету и вектор pAAV-eGFP амплифицировали с помощью пар праймеров (соответственно 5'-GGAGTTCGGAACGTCTGCCCTTACCGAGG-3', 5'-CGTTGGCTGC-GAGTGATGACGAGCCATTTGTCTCGAGGTC-GAGAATTCAAAA-3' и 5'-CACTCGCAGCCAACGACGCGGGCAGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT-3', 5'-CAGACGTTCCGGAACCTCCATATGGGCTATGAACTAATG-3'). Клонирование проводили с использованием набора NEBuilder HiFi DNA Assembly ("NEB", США, E5520S). Полученные векторы названы pAAV-shGnao1/1-eGFP и pAAV-shSCR-eGFP.

pMusGNAO1. Плазмиду с кодирующей областью *Gnao1* мыши (CCDS22532.1) создавали по такой же технологии, как и pGNAO1. CDS *Gnao1* амплифицировали из образцов мозга мыши с праймерами 5'-CGCTACCGGTCCGACCATGGATGTACGCTGAGCGC-3' и 5'-TCAGTTATCTAGATCCGGTGGATTTCAGTACAAGCCG-CAGCC-3', вектор готовили с помощью праймеров 5'-ATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATATCA-3' и 5'-GGTGGCGACCGGTAGCG-3'.

Нуклеотидную последовательность векторов подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Проверка плазмидных конструкций в НЕК293Т. Сверхэкспрессию трансгенов и скрининг shPHK для подавления *Gnao1* проводили в культуре клеток НЕК293Т (ATCC) путем трансфекции плазмид. Клетки культивировали в среде DMEM ("Gibco", 11995) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного скота ("BioSera", Франция, FB-1001/500) и пенициллина-стрептомицина ("ПанЭко", Россия, А063). В день трансфекции клетки снимали с подложки 0.05%-ным раствором трипсина, осаждали, ресуспендировали в среде DMEM и рассевали в 24-луночный планшет в количестве 350000 клеток на лунку. Плазмидную ДНК (250 нг), содержащую 2.5 нг pAAV-GNAO1 или смесь плазмид (2.5 нг pMusGnao1, 2.5 нг pEGFP-C1, 100 нг pLKO.1-shPHK), добавляли к раствору линейного полиэтиленimina (ЛПЭИ) ("Polysciences", США, 23966-1) в среде DMEM в массовом соотношении 1 : 4 (ДНК : ЛПЭИ). Трансфекционную смесь инкубировали в течение 20 мин и добавляли к клеткам. Через 72 ч после трансфекции клетки собирали и методом вестерн-блоттинга определяли в них содержание белка Gαo1.

Наработка и очистка вирусов. Рекомбинантные ААВ получали с помощью системы AAV Helper-Free System ("Agilent", США) в прикрепленной культуре НЕК293Т (ATCC) по ранее описанному протоколу [24]. Вирусы разных серотипов нарабатывали с использованием плазмидных кон-

струкций, кодирующих белки Rep и Cap, – pAAV-RC1 ("Cell Biolabs", США), pAAV-RC2 ("Agilent"), pAAV-RC6 ("Cell Biolabs"), pAAV-RC9 ("Penn Vector Core") и pAAV-DJ ("Cell Biolabs"). В качестве векторной плазмиды использовали pAAV-eGFP, а также pAAV-GNAO1-wt-мус, pAAV-GNAO1-G203R-flag, pAAV-shSCR-eGFP или pAAV-shGnao1/1-eGFP. Вирусные частицы ААВ очищали с помощью универсального для всех серотипов метода, основанного на центрифугировании в градиенте плотности йодиксанола [24, 25]. Методом количественной ПЦР контролировали титр вирусных частиц на стадиях продукции, очистки и конечного концентрированного препарата [24]. Отсутствие белковых примесей подтверждали окрашиванием Кумасси в полиакриламидном геле согласно стандартному протоколу (Coomassie Brilliant blue, G250, "Helicon", Россия).

Первичная нейрональная культура. Первичную нейрональную культуру получали из цельного головного мозга новорожденных мышей линии CD-1 согласно протоколу [26] с модификациями. Извлеченный головной мозг промывали в охлажденной среде DMEM ("Gibco"), содержащей 15 мМ HEPES, и измельчали скальпелем до однородной массы. Измельченную ткань обрабатывали 0.25% раствором трипсин-EDTA ("ПанЭко") с добавлением 10 нг/мкл ДНКазы I ("PanReac Aprilichem", Испания) при 37°C в течение 20 мин. Затем добавляли ингибитор трипсина ("ПанЭко", P071) и центрифугировали суспензию при 1000 г в течение 7 мин. Супернатант удаляли и ресуспендировали ткань в 10 мл HEPES-DMEM с последующим центрифугированием и удалением супернатанта. Промывку повторяли 2 раза, после чего клетки пропускали через клеточное сито с диаметром пор 70 мкм. Затем клетки центрифугировали при 1000 г в течение 5 мин и заменяли раствор на полную среду Neurobasal-A ("Gibco"), содержащую добавку B-27 ("Gibco") и 2 мМ аланил-глутамин ("ПанЭко"). Для проведения вестерн-блоттинга клетки высевали в 12-луночные планшеты, для анализа цитотоксичности – в 96-луночные. Для анализа методом иммунофлуоресценции клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты на покровные стекла размером 24 × 24 мм (Menzel coverslips). Поверхность планшетов и стекла предварительно покрывали поли-D-лизин ("Sigma-Aldrich", США). Клетки высевали при расчетной плотности ~100000 клеток/см² и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Изображения клеток получали на инвертированном микроскопе с фазовым контрастом Nikon Ti-E.

Вирусная трансдукция. Первичную нейрональную культуру заражали ААВ на 7-й день культивирования. К нейронам в полной нейробазальной среде добавляли очищенный препарат вируса

из расчета 1×10^5 геномных копий (ГК) на клетку. После заражения клетки инкубировали в течение еще 7 дней до анализа образцов.

Цитотоксичность. Выживаемость клеток после трансдукции препаратами ААВ оценивали с использованием реагента PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (“Invitrogen”, США, A13261). В качестве контроля использовали незараженные клетки. Анализ проводили в 96-луночном культуральном планшете согласно инструкции производителя. После добавления реагента клетки инкубировали при 37°C в течение 1.5 ч. Определяли поглощение при длине волны 570 нм на планшетном ридере Clariostar Plus (“BMG Labtech”, Германия). Полученные значения нормировали по поглощению при 600 нм. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения MARS (“BMG Labtech”).

Вестерн-блоттинг. Белковый экстракт клеток НЕК293Т готовили в буфере RLB (“Promega”, США, E397A) согласно инструкциям производителя. Первичные нейроны мыши лизировали в охлажденном буфере (50 мМ Трис-НСl рН 7.4, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мМ EGTA, 1% Тритона X-100, 0.1% натрия дезоксихолата и 0.1% додецилсульфата натрия) [27] и осветляли центрифугированием при 17000 g в течение 5 мин при 4°C. Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью реагента Quick Start Bradford 1× Dye Reagent (“Bio-Rad”, США, 5000205) на планшетном ридере Clariostar Plus (“BMG Labtech”). Белковый экстракт (5–10 мкг) в буфере Лэммли подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя набор Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit (“Bio-Rad”, 170-4270), на приборе Transfer-blot Turbo (“Bio-Rad”). Качество нанесения и эффективность переноса белков оценивали, окрашивая мембрану Ponceau S. Мембрану инкубировали с антителами кролика к Gαo1 мыши и человека (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 5000), GFP (“Sigma”, США, G1544-100UG; 1 : 4500), βIII-тубулину (“Abcam”, Великобритания, ab18207; 1 : 1000), антителами мыши к мус-эпителию (“ThermoFisher Scientific”, MA1-980; 1 : 2000), GAPDH (G8795, “Sigma-Aldrich”; 1 : 20000) или антителами козы к flag-эпителию (“Abcam”, ab1257; 1 : 5000). Затем мембрану инкубировали с вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов кролика (“Bio-Rad”, Cat# 170-6515, 1 : 3000), мыши (“Bio-Rad”, Cat# 170-6516; 1 : 3000) или козы (“Invitrogen”, #81-1620; 1 : 3000). Сигнал детектировали с помощью набора Clarity Western ECL substrate (“BioRad”, #170-5060) на приборе iBright 1500 (“ThermoFisher”). Анализ изображений проводили в программе Fiji [28].

Количественная ПЦР. Суммарную РНК выделяли из инфицированных нейронов с помощью набора ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (“Promega”). Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop™ 8000 и обрабатывали ДНКазой I (“NEB”, M0303). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора MMLV RT kit (SK021, “Евроген”) с использованием смеси случайного (“Евроген”, SB002) и олиго(dT)15 (“Евроген”, SB001) праймеров в концентрации 1 мкМ каждый. Полученную кДНК разводили в 5 раз в воде без нуклеаз (“Евроген”, RB007). Экспериментальный образец (5 мкл) добавляли к 20 мкл ПЦР мастер-микса (“Синтол”, Россия, М-428), содержащего специфические (400 нМ) праймеры и зонды (200 нМ), 2% DMSO и дополнительно 3 мМ MgCl₂. *Gnao1* мыши детектировали с использованием праймеров 5'-ТАСТАССТ-GGACAGCCTGGA-3', 5'-GGATCCAТТСТТGC-GTTCA-3' и зонда 5'-ROX-CGTCGGGGCCAGC-BHQ2-3'. *Gapdh* детектировали с использованием праймеров 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGA-3', 5'-TCCTCAGTGTAGCCCAAGA-3' и зонда 5'-VIC-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCAT-BHQ1-3'. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”). Амплификацию проводили по следующей программе: денатурация при 94°C, 3 мин; далее 40 циклов – 94°C, 15 с и 60°C, 40 с; считывание флуоресцентного сигнала проводили в каналах VIC и ROX. Количество копий транскриптов *Gnao1* определяли по стандартной кривой ДНК-стандарта (плазмида pMusGnao1 с известной концентрацией) и нормировали по уровню *Gapdh*.

Иммунофлуоресценция. Клетки фиксировали на покровных стеклах в течение 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде (“Panreac AppliChem”, 141451.1211) с 2% сахарозы D(+) (“Panreac AppliChem”, 57-50-1) в фосфатно-солевом буфере (“ПанЭко”, В-60201) с последующей пермеабиллизацией в 0.2%-ном Тритоне X-100 (“Amresco”, США, Am-O694-1.0) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере с 3% БСА (“ПанЭко”, РМ-Т1725.50) и 0.2% Тритон X-100.

Первичную культуру нейронов окрашивали поликлональными антителами кролика к βIII-тубулину (“Abcam” ab18207 1 : 300), GFAP (“Abcam” ab7260; 1 : 300) или Gαo1 (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 300). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченные красителем Alexa Fluor 633 (“Invitrogen”, A 21072; 1 : 1000). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (“ThermoFisher Scientific”, H3570, 1 : 1000). Стекла с окрашенными

ми клетками покрывали средой для заключения (ProLong™ Glass Antifade Mountant, “ThermoFisher Scientific”, P3698). Изображения получали на инвертированном микроскопе Leica DM16000 одновременно по двум каналам (Alexa 405, Alexa 633).

Тропизм ААВ анализировали с использованием поликлональных антител кролика к $G\alpha 1$ (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 300) и антител козы против иммуноглобулинов кролика, меченных красителем Alexa Fluor 633 (“Invitrogen”, A 21072; 1 : 1000). Ядра клеток контрастировали красителем Hoechst 33342 (“ThermoFisher Scientific”, H3570, 1 : 1000). Стекла помещали на предметные стекла в среду для заключения. Изображения получали на микроскопе THUNDER Imaging Systems (“Leica”) одновременно по трем каналам (Alexa 405, Alexa 488, Alexa 633). Для каждого образца снято по 144 поля зрения.

Анализ колокализации. Для оценки тропизма ААВ разных серотипов определяли колокализацию трансгенного GFP с эндогенным $G\alpha 1$ мыши ($mG\alpha 1$). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения CellProfiler 4.2.1 [29]. Для каждого изображения в трех каналах выполнена коррекция освещенности “CorrectIllumination” и удаление шума путем наложения фильтра Гаусса “GaussianFilter”. На первом этапе идентифицировали объекты в каждом из каналов. Синий канал — окраска ядер, зеленый канал — флуоресценция GFP, красный канал — окраска специфичными антителами к $G\alpha 1$. Путем сравнения слоев в синем и красном каналах определяли $G\alpha 1$ -позитивные клетки. В дальнейшем определяли позитивные клетки по двум каналам, сравнивая слои с $G\alpha 1$ - и GFP-позитивными клетками. Процент колокализации оценивали как отношение клеток, позитивных по двум каналам, к общему количеству $G\alpha 1$ -позитивных клеток. Проанализировано не менее 1800 $G\alpha 1$ -позитивных клеток каждого образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

G $\alpha 1$ -богатая нейрональная культура

На первом этапе исследований перед нами стояла задача получения первичной нейрональной культуры мыши, богатой $G\alpha 1$ -позитивными клетками. Согласно опубликованным данным, ген *Gnao1* экспрессируется во всех отделах головного мозга грызунов, в том числе в коре больших полушарий, мозжечке, базальных ганглиях, обонятельной луковице [3, 30–32]. Для получения всего многообразия нейрональных клеток, в которых осуществляется $G\alpha 1$ -опосредованная передача сигнала, мы выделяли нейроны из цельного мозга новорожденных мышей, адаптировав ранее описанный протокол [26]. Качество нейронов оценивали через 7 дней после выделения в куль-

туру по морфологии клеток в фазовом контрасте (рис. 2а), а также методом вестерн-блоттинга (рис. 2б) и иммунофлуоресценции (рис. 2в–д). Окрашивание антителами к маркеру β III-тубулину показало, что культура состоит преимущественно из нейронов (рис. 2б, в), а антитела к маркеру GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок) выявили лишь незначительное присутствие астроцитов (рис. 2г). В полученной первичной нейрональной культуре нами обнаружен существенный синтез белка $G\alpha 1$ мыши ($mG\alpha 1$), который детектировали с помощью специфичных антител методами вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции (рис. 2б, д). Таким образом, выделение нейронов из цельного мозга новорожденных мышей позволило получить культуру нейронов, богатую $G\alpha 1$ -позитивными клетками. Эту культуру использовали в дальнейших экспериментах для вирусной доставки.

Тропизм серотипов ААВ к G $\alpha 1$ -позитивным клеткам in vitro

На следующем этапе мы подобрали условия эффективной доставки трансгенов в $G\alpha 1$ -позитивные нейроны мыши *in vitro*. С этой целью использовали контрольный вирусный вектор с репортерным геном eGFP под конститутивным CMV-промотором (рис. 3а). Для упаковки вектора рAAV-eGFP использовали капсиды серотипов 1, 2, 6, 9 и DJ, охарактеризованных ранее как нейротропные в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [15, 16]. Эффективность продукции вирусных частиц в клетках, а также потери в процессе очистки, контролировали методом кПЦР (рис. 3б). Средняя продукция вирусных частиц разных серотипов в неочищенном клеточном лизате различалась до 8 раз и составила 3.8×10^{10} (ААВ1), 1.8×10^{10} (ААВ2), 3.7×10^{10} (ААВ6), 1.6×10^{11} (ААВ9) и 1.1×10^{11} (ААВ-DJ) геномных копий (ГК) на см^2 площади культуральной поверхности. Наиболее высокой была эффективность продукции серотипов ААВ9 и DJ, а самой низкой — серотипа 2, что согласуется с опубликованными данными [33]. Средний выход вирусных частиц разных серотипов после всех стадий очистки варьировал в диапазоне 15–27%. Наибольшая эффективность очистки наблюдалась для серотипов 6 и 9 (27 и 22% соответственно, табл. 1). Наибольшими были потери вирусного материала (до 85%) при очистке ААВ1 и ААВ2. Все препараты ААВ концентрировали до титра $\sim 2 \times 10^{13}$ ГК/мл.

Первичную культуру нейронов мыши заражали вирусными частицами ААВ-eGFP серотипов 1, 2, 6, 9 и DJ при множественности инфекции 10^5 ГК на клетку. Общую эффективность заражения первичной нейрональной культуры разными серотипами ААВ оценивали по уровню экспрессии

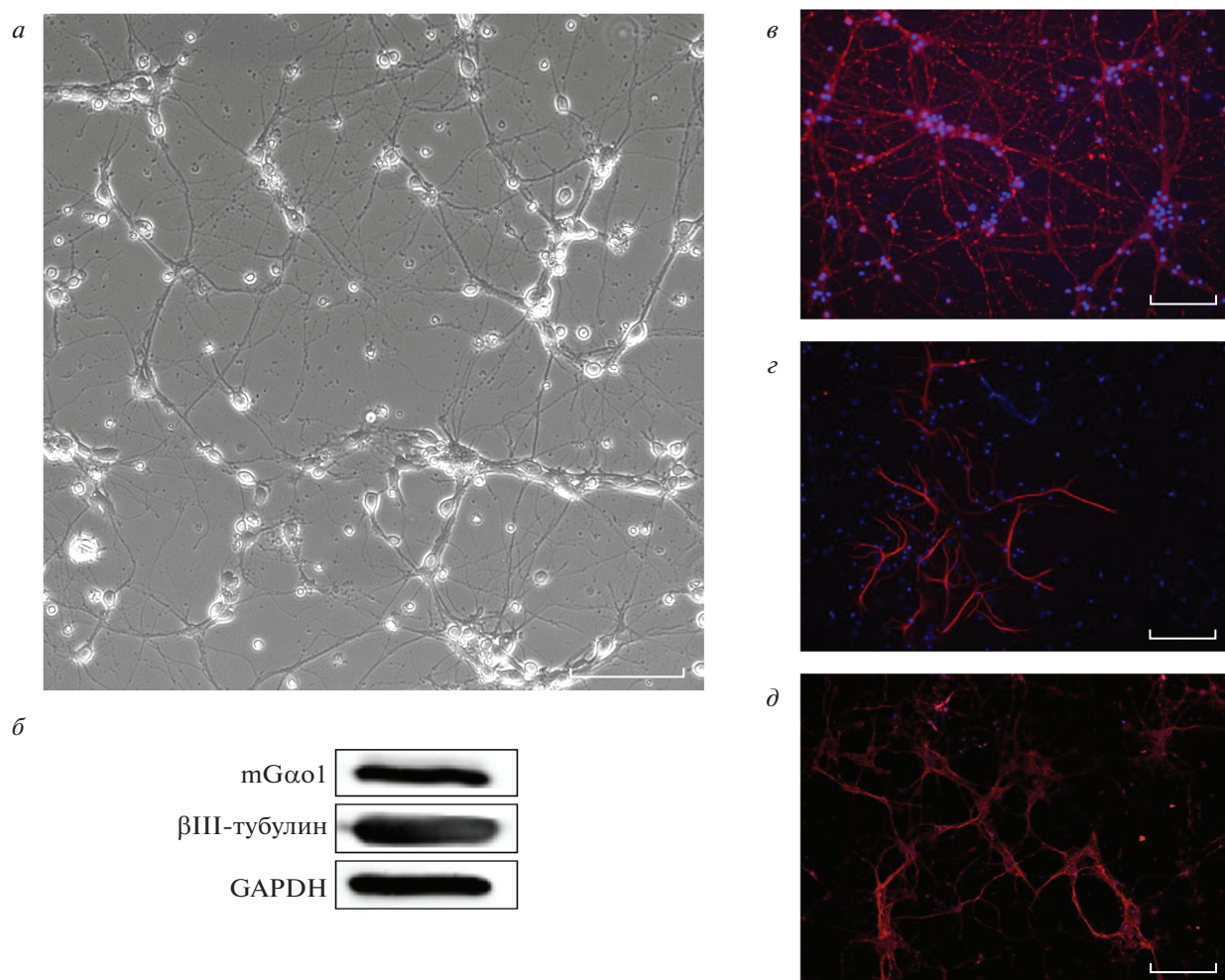


Рис. 2. Оценка качества клеток и экспрессии $G\alpha o1$ в первичной нейрональной культуре, полученной из цельного мозга мышей. *a* – Фазовый контраст; *b* – анализ экспрессии $mG\alpha o1$ и маркера нейронов βIII -тубулина методом вестерн-блоттинга; контроль нагрузки – GAPDH. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры нейронов мыши антителами к нейрональному маркеру βIII -тубулину (*c*), глиальному маркеру GFAP (*e*) и $mG\alpha o1$ (*d*). Окраска специфичными антителами показана красным, ядра контрастированы Hoechst 33342 (синий). На *c* и *d* показаны репрезентативные поля, на *e* показано поле с максимальным количеством GFAP-положительных клеток. Длина масштабного отрезка 100 мкм.

трансгена *eGFP* методом вестерн-блоттинга (рис. 3*в*, *г*). Установлено, что относительный уровень экспрессии *GFP* через 7 дней после трансдукции был выше в культурах, трансдуцированных серотипа-

ми 6 и DJ. Наименьшим уровень экспрессии трансгена был в культуре, трансдуцированной AAB9. Анализ выживаемости первичных нейронов не выявил значительных различий между

Таблица 1. Эффективность очистки вирусных частиц разных серотипов, кодирующих репортерный белок *eGFP*

Серотип AAB	Число независимых экспериментов, <i>n</i>	Средний выход*, %	Стандартное отклонение, %
AAB1	3	15	4
AAB2	4	15	8
AAB6	4	27	16
AAB9	6	22	2
AAB-DJ	4	19	15

* Выход вирусных частиц рассчитан как отношение общего количества ГК в очищенном препарате к общему количеству ГК в исходном клеточном лизате в каждом независимом эксперименте (*n*).

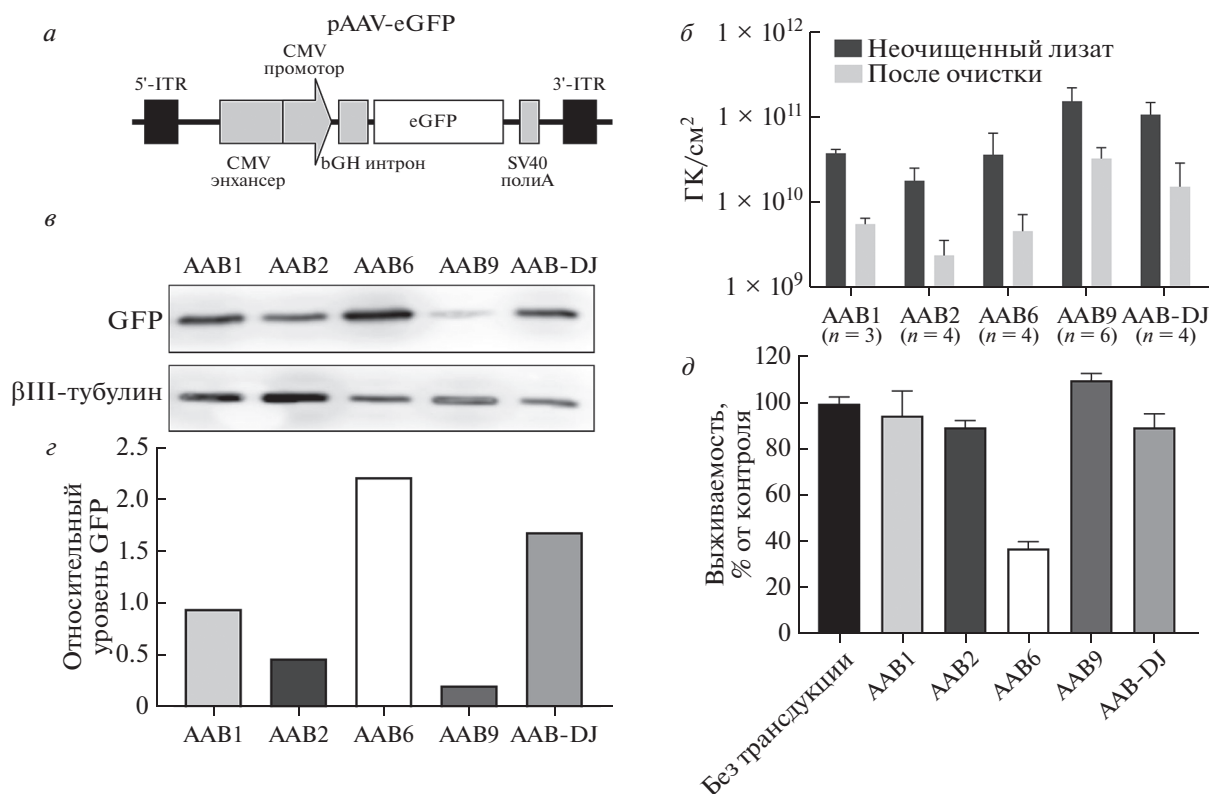


Рис. 3. Получение и тестирование препаратов вируса различных серотипов, кодирующих белок-репортер. *а* – Схема контрольного вирусного вектора, кодирующего репортерный белок eGFP. *б* – Количество вирусных частиц разных серотипов в клеточном лизате и после стадий очистки методом кПЦР. Данные представлены в виде числа геномных копий (ГК)/см² культуральной поверхности. *в* – Количество независимых экспериментов. *г* – Вестерн-блоттинг с лизатами первичной нейрональной культуры, трансдуцированной разными серотипами ААВ при множественности заражения 10⁵ ГК/клетку. Показан уровень экспрессии eGFP через 7 дней после трансдукции. *з* – Количественный подсчет результатов вестерн-блоттинга. Показан относительный уровень экспрессии GFP в нейронах, трансдуцированных разными серотипами ААВ. Уровень экспрессии GFP нормирован по уровню экспрессии βIII-тубулина. *д* – Анализ цитотоксичности разных серотипов в первичной нейрональной культуре мыши. Показан уровень жизнеспособности трансдуцированных клеток в процентах от нетрансдуцированной культуры.

культурами, трансдуцированными серотипами ААВ 1, 2, 9, DJ, и нетрансдуцированными клетками (рис. 3д). Однако обнаружено, что вирусные частицы с капсидом серотипа б проявляли существенную цитотоксичность в отношении первичной нейрональной культуры.

Чтобы выявить серотип ААВ с наибольшим тропизмом к субпопуляции Gαo1-позитивных нейронов, мы изучили колокализацию экспрессии GFP и mGαo1 (рис. 4). С этой целью определили процент Gαo1-позитивных клеток, зараженных ААВ-eGFP (рис. 4а). Все протестированные серотипы ААВ трансдуцировали Gαo1-позитивные клетки, однако с разной эффективностью. Наибольшим тропизмом к Gαo1-позитивным клеткам обладали серотипы ААВ6 и ААВ-DJ: 59 и 66% колокализации соответственно. Серотипы ААВ1, ААВ2 и ААВ9 имели более низкий тропизм – колокализация с целевыми клетками составила только 19, 25 и 8% соответственно. Пример колокализации серотипа ААВ-DJ представлен на рис. 4б.

Таким образом, по результатам скрининга пяти нейротропных серотипов ААВ оптимальным для заражения mGαo1-позитивных нейронов мыши *in vitro* оказался ААВ-DJ. Серотип DJ при множественности 10⁵ ГК на клетку обеспечивал эффективную доставку репортерного трансгена в целевые клетки и обладал низкой цитотоксичностью. Этот серотип использовали в дальнейшем для тестирования потенциальных генотерапевтических подходов и моделирования GNAO1-энцефалопатии.

Экспрессия Gαo1 человека и супрессия эндогенного Gαo1

На заключительном этапе мы проверили эффективность доставки с помощью ААВ-DJ генетических конструкций разных конфигураций, которые потенциально могут быть применены в генной терапии и моделировании GNAO1-энцефалопатии в нейронах мыши *in vitro*. Разработаны две группы экспрессионных ААВ-векторов (рис. 5а, б).

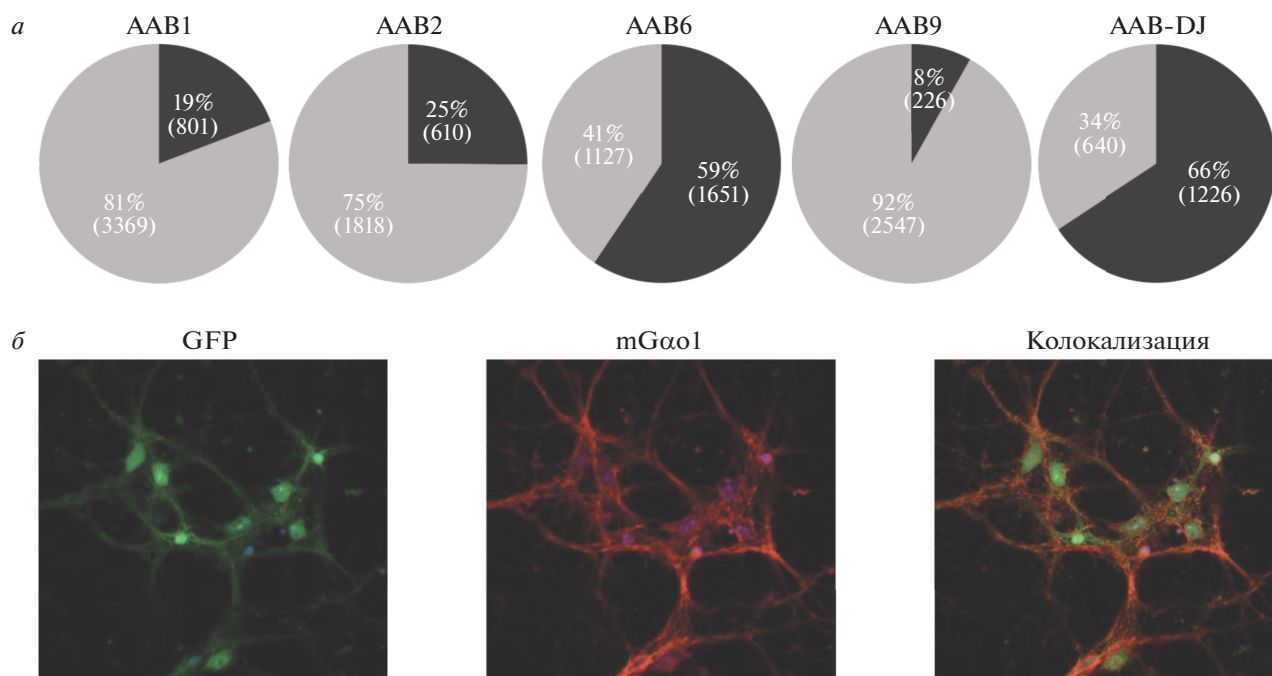


Рис. 4. Анализ тропизма рекомбинантных аденоассоциированных вирусов разных серотипов на первичной нейрональной культуре. *а* – Оценка количества трансдуцированных mGα1-позитивных нейронов мыши. Процент колокализации (черный сегмент) оценивали как отношение mGα1-позитивных клеток, экспрессирующих eGFP, к общему количеству mGα1-позитивных клеток. Количество незараженных mGα1-позитивных нейронов показано серым. В скобках указано количество клеток, участвующих в подсчете. *б* – Пример колокализации сигнала от клеток, трансдуцированных AAB-DJ, экспрессирующих GFP (зеленый), с сигналом от mGα1-позитивных клеток, окрашенных специфичными антителами (красный). Ядра контрастированы Hoechst 33342 (синий).

Первая группа AAB-векторов несет в качестве трангена кодирующие белок последовательности *GNAO1*. Вектор pAAV-GNAO1-wt-мус экспрессирует Gα1 человека (hGα1) дикого типа с мус-эпитопом (рис. 5а). Эту конструкцию можно использовать для тестирования заместительной генной терапии, применимой к пациентам с LOF-мутациями в гене *GNAO1* [12]. С помощью вектора pAAV-GNAO1-G203R-flag можно доставлять мутантную форму трансгенного белка hGα1-G203R для выяснения механизма патогенеза наиболее часто встречающегося варианта. Экспрессию обеих форм hGα1 (нормальной и мутантной) AAB-векторами подтвердили в контексте плазмидной трансфекции в HEK293T с помощью антител, специфичных к мус- и flag-эпитопам соответственно (рис. 5б).

Вторая группа AAB-векторов кодирует shРНК (рис. 5б). Специфичные к *Gnao1* shРНК подавляют экспрессию эндогенного mGα1 на посттранскрипционном уровне посредством РНК-интерференции [20]. Эти векторы можно использовать для моделирования GNAO1-энцефалопатии, вызванной LOF-мутациями, которые приводят к дефициту белка. Кроме того, векторы с shРНК, специфичные к *GNAO1* человека, можно использовать в генотерапевтических подходах, основанных на

супрессии генов и эффективных при GOF-мутациях и мутациях с доминантно-негативным проявлением.

Чтобы подобрать shРНК для эффективного подавления mGα1, мы протестировали три плазмидные конструкции с таргетирующими последовательностями к *Gnao1* (shGnao1/1, shGnao1/2, shGnao1/3) в HEK293T со сверхэкспрессией Gα1 мыши (рис. 5с). В качестве негативных контролей использовали shРНК с нетаргетирующей последовательностью шпильки (shSCR) и последовательностью для подавления GFP (shGFP). Конструкции shGnao1/1 и shGnao1/2 эффективно подавляли продукцию mGα1. Последовательность shGnao1/1 отобрали для создания AAB-вектора (pAAV-shGnao1/1-eGFP), учитывая способность подавлять Gα1 как мыши, так и человека.

С помощью описанных экспрессионных векторов, несущих трансгенный *GNAO1* или shРНК (рис. 5а, б), мы получили очищенные препараты AAB в капсиде DJ. Продукцию и эффективность очистки вирусных частиц оценивали, как в случае вирусов с GFP-репортером. Продукция всех вирусов серотипа DJ в лизате клеток HEK293T была сходной: 8.0×10^{10} (GNAO1-wt-myc), 9.6×10^{10} (GNAO1-G203R-Flag), 7.3×10^{10} (shSCR) и 1.0×10^{11} (shGnao1/1) ГК/см² культуральной поверхности

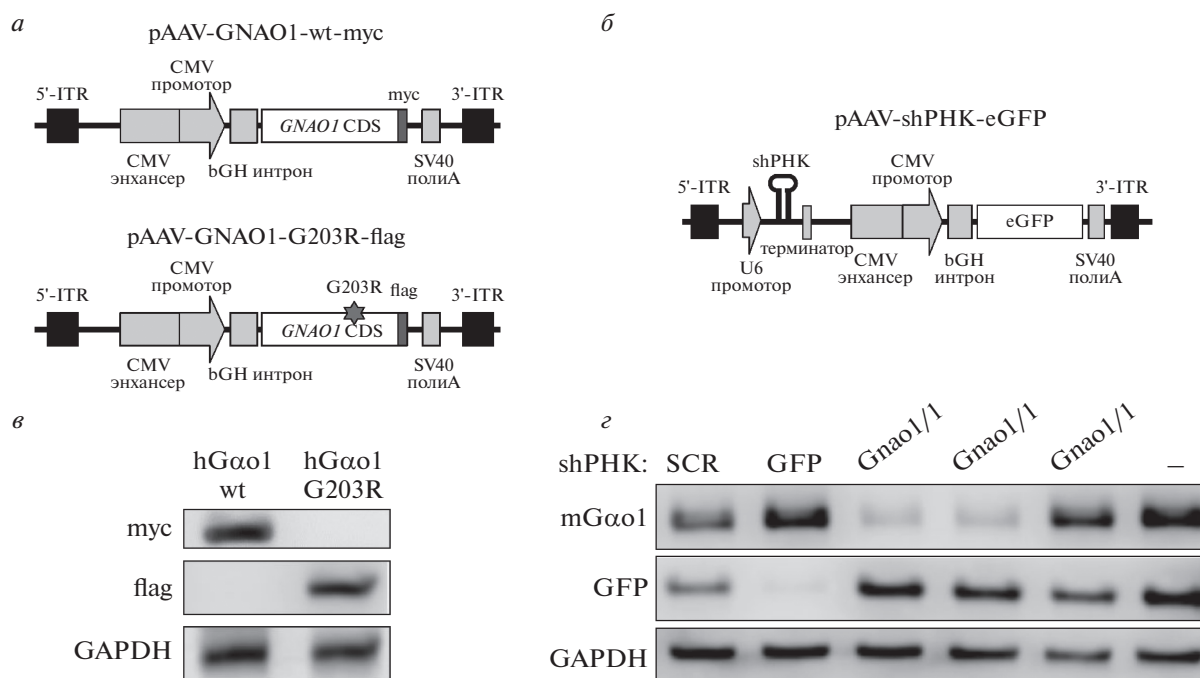


Рис. 5. Скрининг плазмидных конструкций для сверхэкспрессии трансгенного hGαo1 или подавления mGαo1 мыши. *a* – Схема вирусных векторов, кодирующих нормальную или мутантную форму белка hGαo1, меченного мус- или flag-эпитопом соответственно. *б* – Схема вирусного вектора, кодирующего shPHK и GFP в качестве репортерного гена. *в* – Результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию нормальной или мутантной формы hGαo1 в культуре НЕК293Т, трансфицированной разработанными ААВ-векторами. *г* – Результат скрининга shPHK (shGnao1/1, shGnao1/2, shGnao1/3), таргетирующих транскрипт гена *Gnao1*. Конструкции pLKO.1-shPHK транзистентно экспрессировали в культуре клеток НЕК293Т совместно с плазмидой pGnao1, кодирующей mGαo1 мыши. Подавление анализировали методом вестерн-блоттинга с антителами, специфичными к Gαo1, GFP. Контроль нанесения – GAPDH.

(рис. 6а). Выход указанных вирусных препаратов после очистки составил 17, 14, 20 и 12% соответственно. Вирусные препараты сконцентрировали до $2-3 \times 10^{13}$ ГК/мл, отсутствие белковых примесей проверяли, анализируя вирусные частицы в полиакриламидном геле с окрашиванием Кумаси (рис. 6б).

Вирусные препараты добавляли к mGαo1-богатой первичной культуре нейронов из цельного мозга мышей при множественности инфекции 10^5 ГК на клетку. Через 7 дней после инфекции анализировали уровень экспрессии трансгенного hGαo1 человека и эндогенного mGαo1 мыши. Как показано на рис. 6в, ААВ-DJ обеспечивает хорошо детектируемый уровень экспрессии трансгенов *GNAO1*-wt-myc и *GNAO1*-G203R-flag в нейронах на уровне белка. Используя ААВ-DJ для доставки shPHK, нам удалось добиться снижения экспрессии эндогенного *Gnao1* в первичной нейрональной культуре на 85% на уровне РНК и вдвое на уровне белка mGαo1 (рис. 6г, д соответственно).

Таким образом, нами показано, что серотип ААВ-DJ подходит для эффективной доставки в первичные нейроны мыши трансгенов, обеспечивающих сверхэкспрессию Gαo1 человека, и shPHK

для подавления эндогенного *Gnao1*. Подобные условия доставки могут быть использованы как для моделирования GNAO1-энцефалопатии, так и для тестирования подходов генной терапии в нейронах мыши *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирусная доставка генетических конструкций в клетки-мишени широко применяется в фундаментальных исследованиях [34], а также при разработке генотерапевтических препаратов [35]. Популярным вирусным вектором для доставки трансгенов в центральную нервную систему являются рекомбинантные ААВ [18].

В настоящей работе мы оптимизировали ААВ-опосредованную доставку трансгенов в нейрональной культуре, полученной из цельного мозга мышей, с целью проведения исследований по GNAO1-энцефалопатии (рис. 1). Нами проверены пять нейротропных серотипов (1, 2, 6, 9 и DJ) при множественности инфекции 10^5 вирусных геномов на клетку. ААВ6 и ААВ-DJ обеспечили самый высокий уровень экспрессии доставленного GFP-репортера (рис. 3в, г), а также самый высокий тропизм к Gαo1-позитивным нейронам (59 и

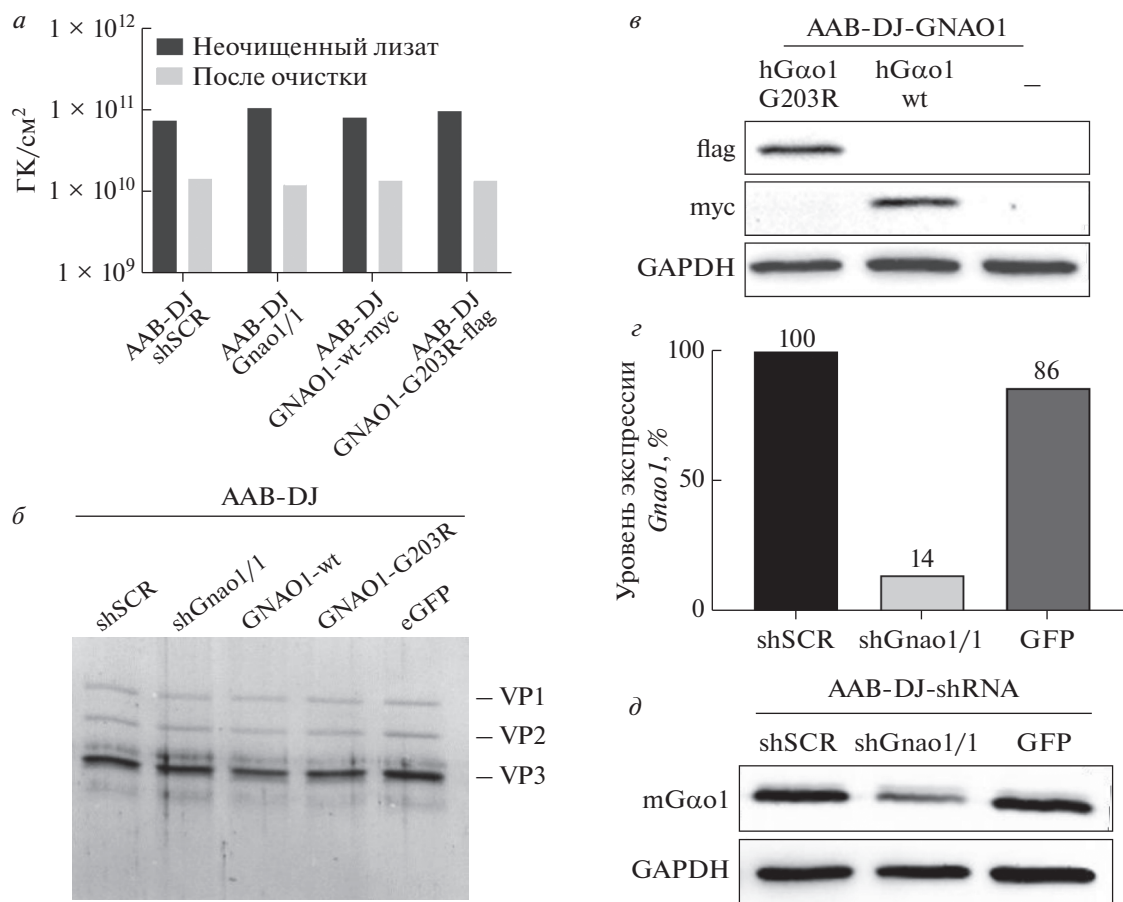


Рис. 6. Получение и тестирование вирусных препаратов для сверхэкспрессии трансгенного hGαo1 или подавления эндогенного *Gnao1* в первичной культуре нейронов из мозга мышей. *а* – Оценка количества целевых AAB в клеточном лизате и после стадий очистки методом кПЦР. *б* – Анализ чистоты вирусных препаратов в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Окрашивание Кумасси: отмечены три белка вирусного капсида (VP1, VP2, VP3). *в* – Вестерн-блот-анализ экспрессии нормальной или мутантной формы hGαo1 в первичных нейронах, трансдуцированных вирусами AAB-DJ-GNAO1-wt-myc и AAB-DJ-GNAO1-G203R-flag. *г* – Анализ подавления экспрессии эндогенного *Gnao1* на уровне транскрипта методом кПЦР после заражения AAB-DJ-shPHK первичной нейрональной культуры. Показан уровень экспрессии (%) от уровня в культуре, трансдуцированной нетаргетирующей контрольной шпилькой (shSCR). *д* – Вестерн-блот-анализ подавления экспрессии mGαo1 в трансдуцированной первичной нейрональной культуре мыши.

66% соответственно) (рис. 4). Установлено, что серотип AAB6, в отличие от AAB-DJ, проявляет существенную цитотоксичность в первичной нейрональной культуре мыши (рис. 3д).

Ранее были опубликованы результаты исследования, в котором сравнивали цитотоксичность и тропизм серотипов AAB1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 в первичной кортикальной культуре крысы [36]. С помощью иммунофлуоресцентного анализа показано, что серотипы AAB2 и AAB9 обеспечивают минимальную экспрессию GFP в трансдуцированной культуре, в то время как в клетках, трансдуцированных серотипами AAB1 и AAB6, наблюдается самая высокая интенсивность сигнала GFP. Эти данные согласуются с нашими результатами, полученными методом вестерн-блотинга (рис. 3г).

Сообщается также о цитотоксичности AAB6, хотя и менее выраженной, чем в наших экспериментах (рис. 3д). Мы предполагаем, что это связано с большей гетерогенностью нейрональной культуры, полученной из цельного мозга, чем кортикальной культуры. Rooy и соавт. [37] также отметили повышенную токсичность AAB6 в гиппокампальной культуре крысы в сравнении с серотипами 1, 2, 5, 7, 8 и 9. Изучив роль аминокислотной последовательности капсида AAB6, установили, что внесение замены K531E в участок капсида, критичный для связывания гепарина, приводит к уменьшению цитотоксичности без снижения эффективности трансдукции нейронов [37]. Серотип AAB-DJ обладает генно-инженерным капсидом, полученным сочетанием восьми природных серотипов [38].

В разных работах показана повышенная способность серотипа DJ трансдуцировать *in vitro* клеточные культуры, в том числе нейрональные [15]. Таким образом, исходя из опубликованных данных и результатов нашего исследования, мы делаем вывод о том, что AAB-DJ является оптимальным серотипом для доставки трансгенов в G α 1-богатую первичную нейрональную культуру, полученную из цельного мозга мышей.

С целью моделирования GNAO1-энцефалопатии, а также тестирования генотерапевтических конструкций, нами созданы AAB-векторы для экспрессии hG α 1 человека и подавления эндогенного *Gnao1* с помощью shРНК (рис. 5а, б). Показано, что серотип DJ обеспечивает эффективную доставку этих генетических конструкций в культуру mG α 1-экспрессирующих нейронов (рис. 6в–д).

Нейроны мышцы с AAB-опосредованной экспрессией hG α 1-G203R могут служить клеточной моделью GNAO1-энцефалопатии с вариантом с.607 G>A (рис. 6в). Эта мутация наиболее часто встречается у пациентов с GNAO1-энцефалопатией [5]. По данным родительских организаций под наблюдением врачей в России находятся четыре таких пациента. При этом данные о влиянии мутации G203R на функциональную активность G α 1 остаются противоречивыми [1, 12, 39]. Нейроны со сниженным с помощью shРНК уровнем эндогенного mG α 1 воспроизводят дефицит функционального белка у пациентов с LOF-мутациями (рис. 6г, д). На таких клеточных моделях можно изучать молекулярный механизм патологии GNAO1-энцефалопатии. В частности, можно исследовать общую функциональную активность AAB-трансдуцированных нейронов (методом визуализации Ca²⁺), возможные нарушения аденилатциклазного каскада, а также электрофизиологические характеристики, такие как сопряжение активности G α 1-содержащих рецепторов с работой потенциалзависимых Ca²⁺-каналов и активируемых G-белком GIRK-каналов. Подобные исследования помогут восполнить пробел в понимании молекулярных механизмов патологии [12], а также скорректировать схему терапии и разработать персонализированные подходы к терапии пациентов с GNAO1-энцефалопатией.

Полученные нами генетические конструкции могут стать основой для создания генотерапевтических препаратов. Так, конструкция pAAV-GNAO1-wt-мус потенциально может использоваться в заместительной терапии пациентов с LOF-мутациями и дефицитом нормального G α 1 в тканях мозга (рис. 5а). AAB-вектор с shGnao1/1 обладает таргетной последовательностью (TRCN0000036487), универсальной для супрессии G α 1 как мыши, так и человека (рис. 5б). Следовательно, вектор pAAV-shGnao1/1 можно адаптировать для су-

прессии генного продукта с GOF-мутацией или доминантно-негативным проявлением. Аналогичная генотерапевтическая стратегия описана для других неврологических заболеваний [40–43]. В одном из вариантов этой стратегии (так называемая “Silence-and-replace” [20, 44]) shРНК подавляет экспрессию как мутантного, так и нормального аллеля, при этом параллельно доставляется функциональная копия гена в том же или в другом AAB-векторе. Проверку экспрессии генотерапевтических конструкций для GNAO1-энцефалопатии можно проводить на первичных нейронах, используя AAB-DJ в качестве инструмента для доставки.

Серотип AAB-DJ может использоваться также в качестве средства доставки в новых подходах к генной терапии GNAO1-энцефалопатии, таких как CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas13 и молекулярные редакторы оснований ДНК [21].

Таким образом, созданные в нашей работе генетические конструкции и оптимизированные протоколы с применением AAB помогут продвигаться в понимании механизмов патогенеза GNAO1-энцефалопатии и могут лечь в основу генотерапевтических препаратов.

Мы благодарим за помощь в клонировании ряда плазмидных конструкций Усачёва Е.В. (Лаборатория трансляционной биомедицины НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), Лосеву Е.М. и Лучкину Е.А. (ООО “Марлин Биотех”) за помощь в клонировании и первичную проверку плазмидных векторов, Веляева О.А. (ООО “Марлин Биотех”) за продукцию и очистку плазмидных векторов, Хаматову А.Ю. (ООО “Марлин Биотех”) за определение титра вирусных препаратов методом КПЦР.

Работа проведена с использованием оборудования ИБР им. Н.К. Кольцова РАН. Мы благодарим за предоставленное оборудование Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины (Институт биологии гена), развиваемый при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН (Москва, Россия). От родителей пациента с вариантом *GNAO1* с.607 G>A получено письменное информированное согласие на проведение биопсии и участие в научных исследованиях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura K., Kodera H., Akita T., Shiina M., Kato M., Hoshino H., Terashima H., Osaka H., Nakamura S., Tohyama J., Kumada T., Furukawa T., Iwata S., Shi-hara T., Kubota M., Miyatake S., Koshimizu E., Nishi-yama K., Nakashima M., Tsurusaki Y., Miyake N., Ha-yasaka K., Ogata K., Fukuda A., Matsumoto N., Saitu H. (2013) *De novo* mutations in GNAO1, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 496–505.
2. EuroEPINOMICS-RES Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, and Epi4K Consortium (2014) *De novo* mutations in synaptic transmission genes including *DNM1* cause epileptic encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 360–370.
3. Worley P.F., Baraban J.M., Van Dop C. (1986) Go, a guanine nucleotide-binding protein: immunohistochemical localization in rat brain resembles distribution of second messenger systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4561–4565.
4. Jiang M., Bajpayee N.S. (2009) Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals.* **17**, 23–41.
5. Feng H., Khalil S., Neubig R.R., Sidiropoulos C. (2018) A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol. Dis.* **116**, 131–141.
6. Ananth A.L., Robichaux-Viehoever A., Kim Y.M., Hanson-Kahn A., Cox R., Enns G.M., Strober J., Willing M., Schlagger B.L., Wu Y.W., Bernstein J.A. (2016) Clinical course of six children with GNAO1 mutations causing a severe and distinctive movement disorder. *Pediatr. Neurol.* **59**, 81–84.
7. Danti F.R., Serena Galosi S., Romani M., Montomoli M., Carss K.J., Raymond F.L., Parrini E., Bianchini C., McShane T., Dale R.C., Mohammad S.S., Shah U., Mahant N., Ng J., McTague A., Samanta R., Vadlamani G., Valente E.M., Leuzzi V., Kurian M.A., Guerrini R. (2017) GNAO1 encephalopathy: broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol. Genet.* **3**, 143.
8. Menke L.A., Engelen M., Alders M., Odekerken V.J.J., Baas F., Cobben J.M. (2016) Recurrent GNAO1 mutations associated with developmental delay and a movement disorder. *J. Child. Neurol.* **31**, 1598–1601.
9. Saitu H., Fukai R., Ben-Zeev B., Sakai Y., Mimaki M., Okamoto N., Suzuki Y., Monden Y., Saito H., Tziperman B., Torio M., Akamine S., Takahashi N., Osaka H., Yamagata T., Nakamura K., Tsurusaki Y., Nakashima M., Miyake N., Shiina M., Ogata K., Matsumoto N. (2015) Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 129–134.
10. Roddy D.W., Farrell C., Doolin K., Roman E., Tozzi L., Frodl T., O’Keane V., O’Hanlon E. (2019) The hippocampus in depression: more than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression. *Biol. Psychiatry.* **85**, 487–497.
11. Kim S.Y., Shim Y., Ko Y.J., Park S., Jang S.S., Lim B.C., Ki Joong Kim K.J., Chae J. (2020) Spectrum of movement disorders in GNAO1 encephalopathy: in-depth phenotyping and case-by-case analysis. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **15**, 1–6.
12. Feng H., Sjögren B., Karaj B., Shaw V., Gezer A., Neubig R.R. (2017) Movement disorder in GNAO1 encephalopathy associated with gain-of-function mutations. *Neurology.* **89**, 762–770.
13. Arya R., Spaeth C., Gilbert D.L., Leach J.L., Holland K.D. (2017) GNAO1-associated epileptic encephalopathy and movement disorders: c.607G>A variant represents a probable mutation hotspot with a distinct phenotype. *Epileptic. Disord.* **19**, 67–75.
14. Bedbrook C.N., Deverman B.E., Gradinaru V. (2018) Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 323–348.
15. Haery L., Deverman B.E., Matho K.S., Cetin A., Woodard K., Cepko C., Guerin K.I., Rego M.A., Erasing I., Bachle S.M., Joanne Kamens J., Fan M. (2019) Adeno-associated virus technologies and methods for targeted neuronal manipulation. *Front. Neuroanat.* **13**. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.0093>
16. Hammond S.L., Leek A.N., Richman E.H., Tjalkens R.B. (2017) Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS One.* **12**, e0188830.
17. Kondratov O., Kondratova L., Mandel R.J., Coleman K., Savage M.A., Gray-Edwards H.L., Ness T.J., Rodriguez-Lebron E., Bell R.D., Rabinowitz J., Gamlin P.D., Zolotukhin S. (2021) A comprehensive study of a 29-capsid AAV library in a non-human primate central nervous system. *Mol. Ther.* **29**, 2806–2820.
18. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **18**, 358–378.
19. Hocquemiller M., Giersch L., Audrain M., Parker S., Cartier N. (2016) Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum. Gene. Ther.* **27**, 478–496.
20. Borel F., Kay M.A., Mueller C. (2014) Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol. Ther.* **22**, 692–701.
21. Wang D., Zhang F., Gao G. (2020) CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and in vivo delivery by AAV vectors. *Cell.* **181**, 136–150.
22. Moffat J., Grueneberg D.A., Yang X., Kim S.Y., Klempfer A.M., Hinkle G., Piqani B., Eisenhaure T.M., Luo B., Grenier J.K., Carpenter A.E., Foo S.Y., Stewart S.A., Stockwell B.R., Hacohen N., Hahn W.C., Lander E.S., Sabatini D.M., Root D.E. (2006) A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* **124**, 1283–1298.
23. Addgene: Protocol pLKO.1–TRC Cloning Vector. <https://www.addgene.org/protocols/plko/> (accessed January 31, 2022)
24. Starikova A.V., Skopenkova V.V., Polikarpova A.V., Reshetov D.A., Vassilieva S.G., Velyaev O.A., Shmidt A.A., Savchenko I.M., Soldatov V.O., Egorova T.V., Bardina M.V. (2022) Therapeutic potential of highly functional codon-optimized microutrophin for muscle-specific expression. *Sci. Rep.* **12**, 1–13.

25. Buclez P.O., Dias Florencio G., Relizani K., Beley C., Garcia L., Benchaouir R. (2016) Rapid, scalable, and low-cost purification of recombinant adeno-associated virus produced by baculovirus expression vector system. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* **3**, 16035.
26. Nikitin E.S., Bal N.V., Malyshev A., Ierusalimsky V.N., Spivak Y., Balaban P.M., Volgushev M. (2017) Encoding of high frequencies improves with maturation of action potential generation in cultured neocortical neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 28.
27. Geissler M., Gottschling C., Aguado A., Rauch U., Wetzel C.H., Hatt H., Faissner A. (2013) Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *J. Neurosci.* **33**, 7742.
28. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* **9**, 676–682.
29. Carpenter A.E., Jones T.R., Lamprecht M.R., Clarke C., Kang I.H., Friman O., Guertin D.A., Chang J.H., Lindquist R.A., Moffat J., Golland P., Sabatini D.M. (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **7**, 1–11.
30. Masuho I., Mototani Y., Sahara Y., Asami J., Nakamura S., Kozasa T., Inoue T. (2008) Dynamic expression patterns of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GRIN1) and its colocalization with G α implicate significant roles of G α -GRIN1 signaling in nervous system. *Dev. Dyn.* **237**, 2415.
31. Choi J.M., Kim S.S., Choi C.H., Cha H.L., Oh H.H., Ghil S., Lee Y.D., Birnbaumer L. (2016) Development of the main olfactory system and main olfactory epithelium-dependent male mating behavior are altered in Go-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 10974–10979.
32. GNAO1 protein expression summary – The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000087258-GNAO1> (accessed January 25, 2022)
33. Vandenberghe L.H., Xiao R., Lock M., Lin J., Korn M., Wilson J.M. (2010) Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing. *Hum. Gene Ther.* **21**, 1251–1257.
34. Nectow A.R., Nestler E.J. (2020) Viral tools for neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 669–681.
35. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 1–24.
36. Howard D.B., Powers K., Wang Y., Harvey B.K. (2008) Tropism and toxicity of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9 in rat neurons and glia *in vitro*. *Virology.* **372**, 24–34.
37. Royo N.C., Vandenberghe L.H., Ma J.Y., Hauspurg A., Yu L.Y., Maronski M., Johnston J., Dichter M.A., Wilson J.M., Watson D.J. (2008) Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Res.* **1190**, 15.
38. Grimm D., Lee J.S., Wang L., Desai T., Akache B., Storm T.A., Kay M.A. (2008) *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* **82**, 5887.
39. Muntean B.S., Masuho I., Dao M., Sutton L.P., Zucca S., Iwamoto H., Patil D.N., Wang D., Birnbaumer L., Blakely R.D., Grill B., Martemyanov K.A. (2021) G α is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell Rep.* **34**, 108718.
40. Aimiwu O.V., Fowler A.M., Sah M., Teoh J.J., Kamber A., Pyne N.K., Petri S., Chana Rosenthal-Weiss C., Mu Yang M., Scott Q., Harper S.Q., Wayne N., Frankel W.N. (2020) RNAi-based gene therapy rescues developmental and epileptic encephalopathy in a genetic mouse model. *Mol. Ther.* **28**, 1706–1716.
41. Choudhury S.R., Harris A.F., Cabral D.J., Keeler A.M., Sapp E., Ferreira J.S., Gray-Edwards H.L., Johnson J.A., Johnson A.K., Su Q., Stoica L., DiFiglia M., Aronin N., Martin D.R., Gao G., Sena-Esteves M. (2016) Widespread central nervous system gene transfer and silencing after systemic delivery of novel AAV-AS vector. *Mol. Ther.* **24**, 726–735.
42. Martier R., Liefhebber J.M., Garcia-Osta A., Miniarikova J., Cuadrado-Tejedor M., Espelousin M., Ursua S., Petry H., van Deventer S., Evers M.M., Konstantinova P. (2019) Targeting RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and/or FTD by RNAi-based gene therapy. *Mol. Ther. Nucl. Acid.* **16**, 26–37.
43. Nobre R.J., Lobo D.D., Henriques C., Duarte S.P., Lopes S.M., Silva A.C., Lopes M.M., Mariet F., Schwarz L.K., Baatje M.S., Ferreira V., Vallès A., Almeida L., Evers M.M., Toonen L.J.A. (2021) MiRNA-mediated knockdown of ATXN3 alleviates molecular disease hallmarks in a mouse model for spinocerebellar ataxia type 3. *Nucl. Acid Ther.* <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0020>
44. Strings-Ufombah V., Malerba A., Kao S.C., Harbaran S., Roth F., Cappellari O., Lu-Nguyen N., Takahashi K., Mukadam S., Kilfoil G., Claudia Kloth C., Roelvink P., Dickson G., Trollet C., Suhy D. (2021) BB-301: a silence and replace AAV-based vector for the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **24**, 67–78.

EFFECTIVE VIRAL DELIVERY OF GENETIC CONSTRUCTS INTO NEURONS FOR *in vitro* MODELING GNAO1-ENCEPHALOPATHY AND GENE THERAPY TESTING

E. A. Lunev^{1, 2, 3}, A. A. Shmidt¹, S. G. Vassilieva¹, I. M. Savchenko¹, V. A. Loginov¹, V. I. Marina², T. V. Egorova¹, and M. V. Bardina^{1, 2, 3, *}

¹ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

² *Marlin Biotech LLC, Sochi, 354340 Russia*

³ *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: maryana.bardina@gmail.com

GNAO1 encephalopathy is an orphan genetic disease associated with early infantile epilepsy, impaired motor control, and severe developmental delay. The disorder is caused by mutations in the *GNAO1* gene, leading to dysfunction of the encoded protein G α o1. There is no cure for this disease, and symptomatic therapy is ineffective. Phenotypic heterogeneity highlights the need for a personalized approach for treating patients with a specific clinical variant of GNAO1 and requires the study of the disease mechanism in animal and cell models. Towards this aim, we developed an approach for modeling GNAO1 encephalopathy and testing gene therapy drugs in primary neurons derived from healthy mice. We optimized the delivery of transgenes to G α o1-expressing neurons using recombinant adeno-associated viruses (rAAV). We assessed the tropism of five neurotropic AAV serotypes (1, 2, 6, 9, DJ) for G α o1-positive neurons from the whole mouse brain. The DJ serotype showed the highest potential as a reporter delivery vehicle, infecting up to 66% of G α o1-expressing cells without overt cytotoxicity. We demonstrated that AAV-DJ also provides efficient delivery and expression of genetic constructs encoding normal and mutant G α o1, as well as short hairpin RNA (shRNA) to suppress endogenous Gnao1 in murine neurons. Our results will further simplify the study of the pathological mechanism for clinical variants of GNAO1, as well as optimize the testing of gene therapy approaches for GNAO1 encephalopathy in cell models.

Keywords: adeno-associated viruses, GNAO1 encephalopathy, G α o1, viral delivery, *in vitro* modeling of human diseases, gene therapy, personalized medicine, primary neuronal culture, short hairpin RNA