

Модели наследственных патологий сетчатки и подходы генной терапии



Санкт-Петербургский
государственный университет

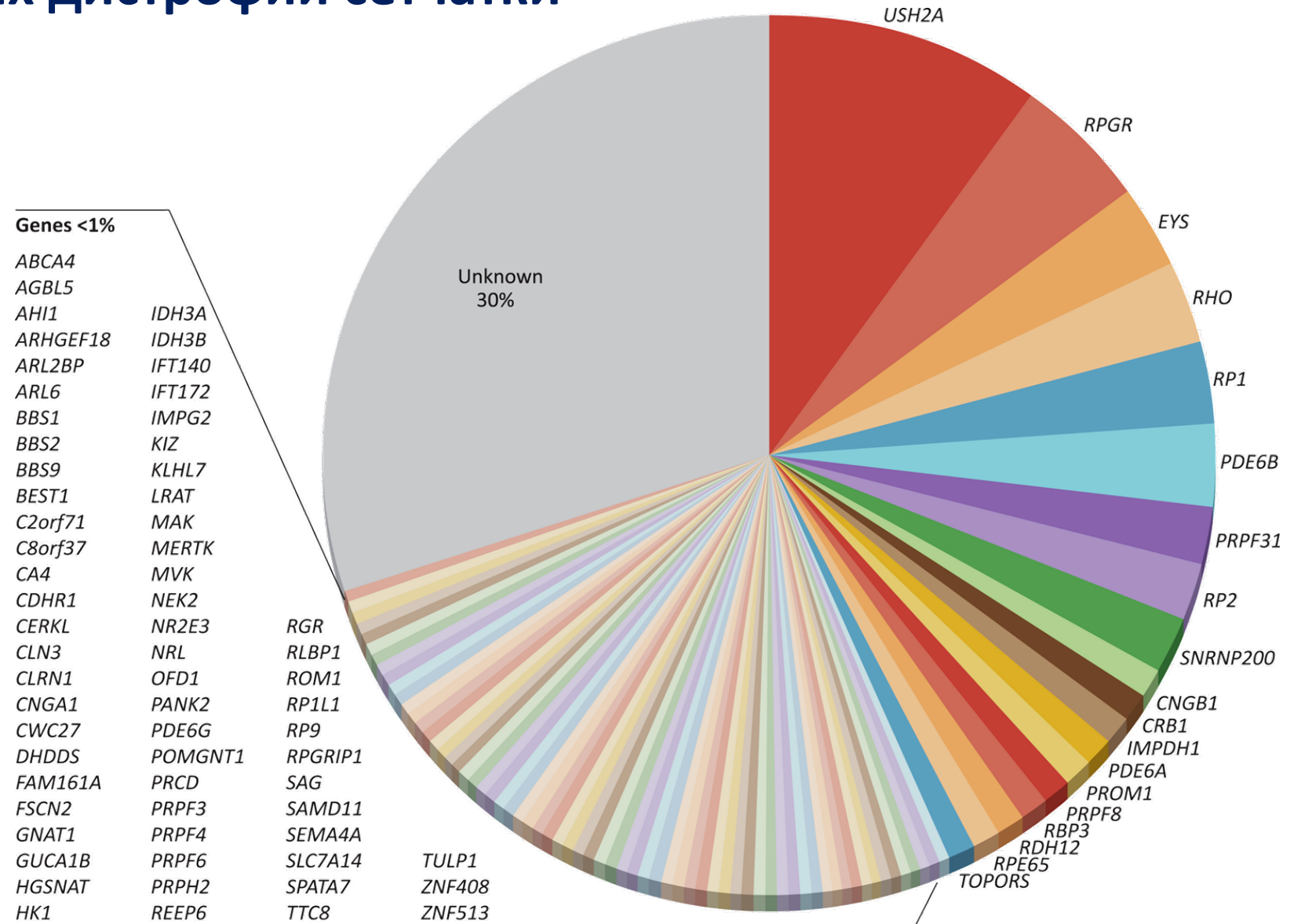
Леонова Елена Ивановна

к.б.н., Директор центра трансгеноза и редактирования
генома СПбГУ

Санкт-Петербург, 2023

Пигментный ретинит – группа наследственных дистрофий сетчатки

- Группа заболеваний, которые приводят к ухудшению зрения или неизлечимой слепоте из-за потери или дисфункции фоторецепторов
- Причиной могут быть мутации во многих разных генах (порядка 300). Определение конкретной мутации в гене имеет решающее значение для понимания спектра симптомов и возможностей лечения

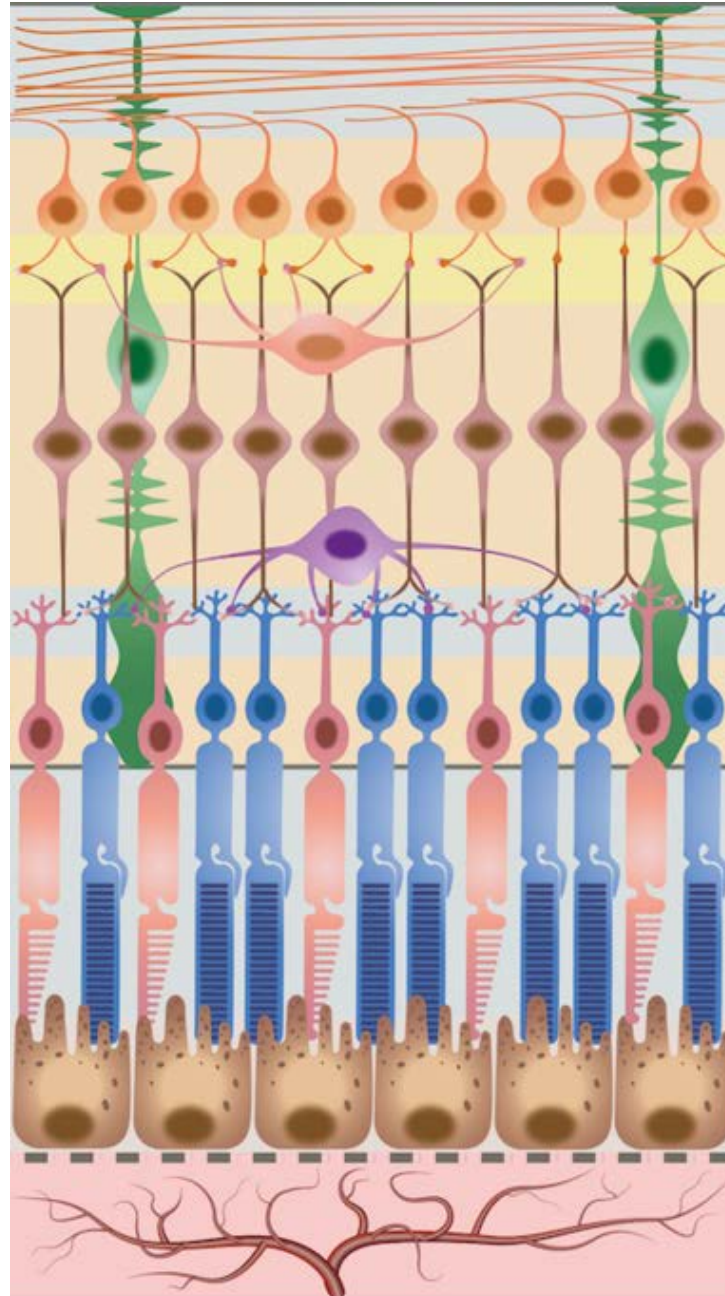
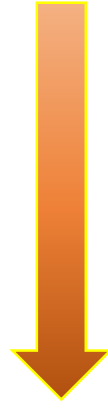


Строение сетчатки глаза

Стекловидное тело

Важнейшие этапы передачи сигнала:

Свет



Ганглиозные клетки (GCL)

Внутренний ядерный слой (INL)
Биполярные клетки

Внешний ядерный слой (ONL)
Фоторецепторы:
палочки и колбочки

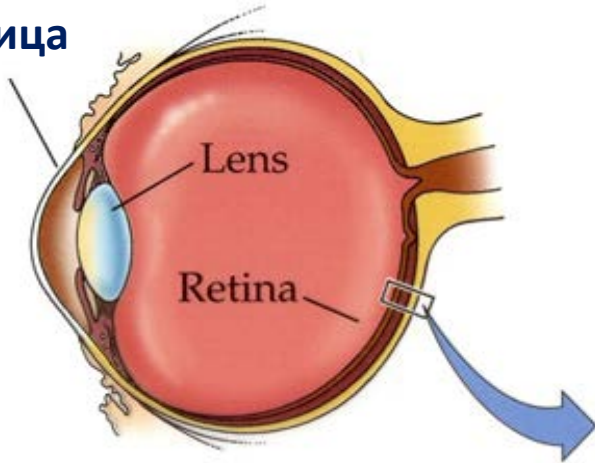
Пигментный
эпителий сетчатки

Направление
фототрансдукции



Склера

Роговица



Lens

Retina

Стадии дегенерации фоторецепторов

Генная терапия



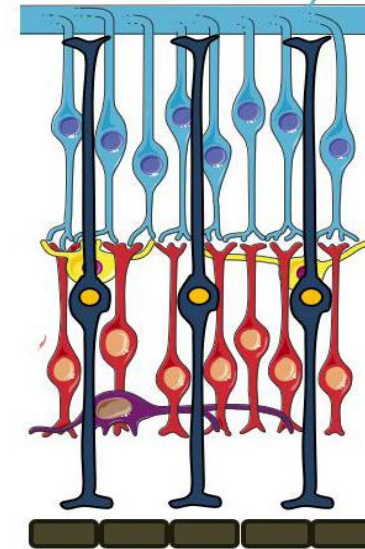
Дегенерация фоторецепторов

На начальной стадии происходит гибель палочек, прогрессирующая от периферии к центру, что проявляется как потеря зрения в темное время суток



В дальнейшем погибают колбочки (фоторецепторы дневного зрения), в результате чего поле зрения сужается и затем наступает полная слепота

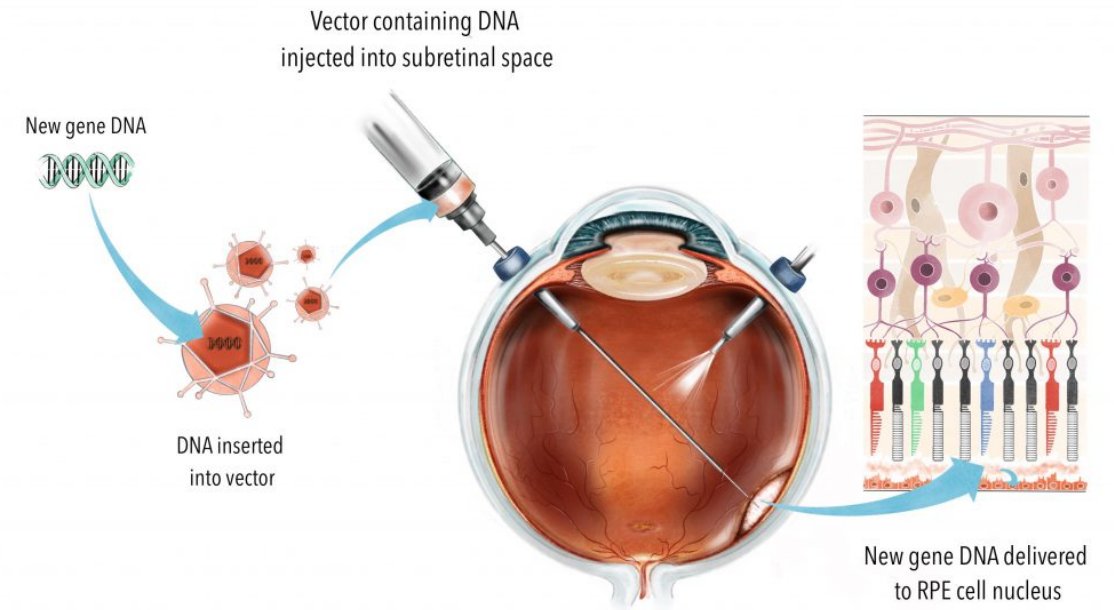
Оптогенетика



Полная потеря фоторецепторов

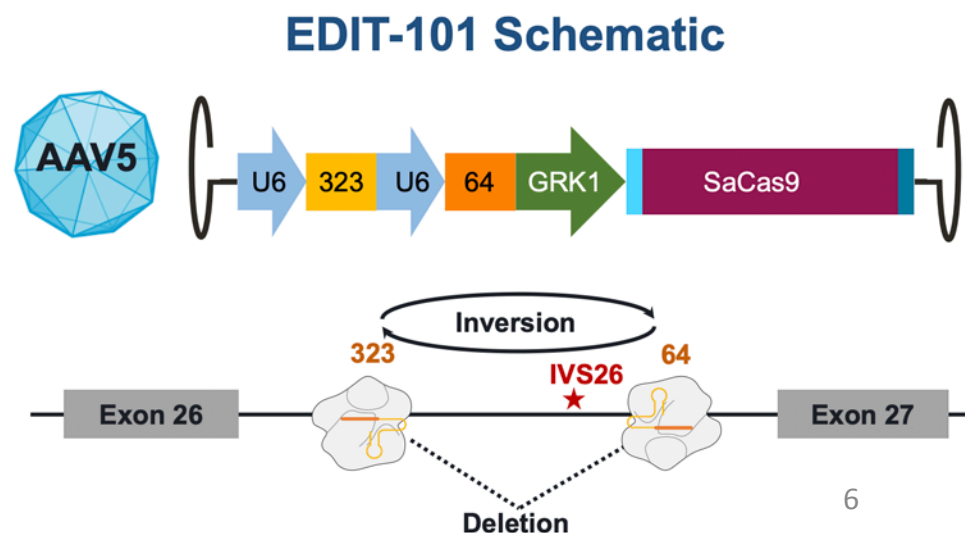
Лимитирующие факторы генной терапии пигментного ретинита

- ❑ Обширная генетическая гетерогенность заболеваний накладывает значительные ограничения на разработку и применение стратегий для таргетной генной терапии.
- ❑ Частицы AAV могут упаковывать только до 4,7 т.п.н. ДНК, что представляет собой серьезное препятствие для доставки более крупных генов.
- ❑ Введение дополнительной копии гена неэффективно при заболеваниях, вызванных доминантными мутациями.
- ❑ Генная заместительная терапия в настоящее время не может быть применена к сложным многофакторным заболеваниям сетчатки, включая возрастную дегенерацию желтого пятна (ВМД), глаукому и диабетическую ретинопатию, которые характеризуются полигенным типом наследования.



Амавроз Лебера может быть вызван мутациями как минимум в 28 различных генах

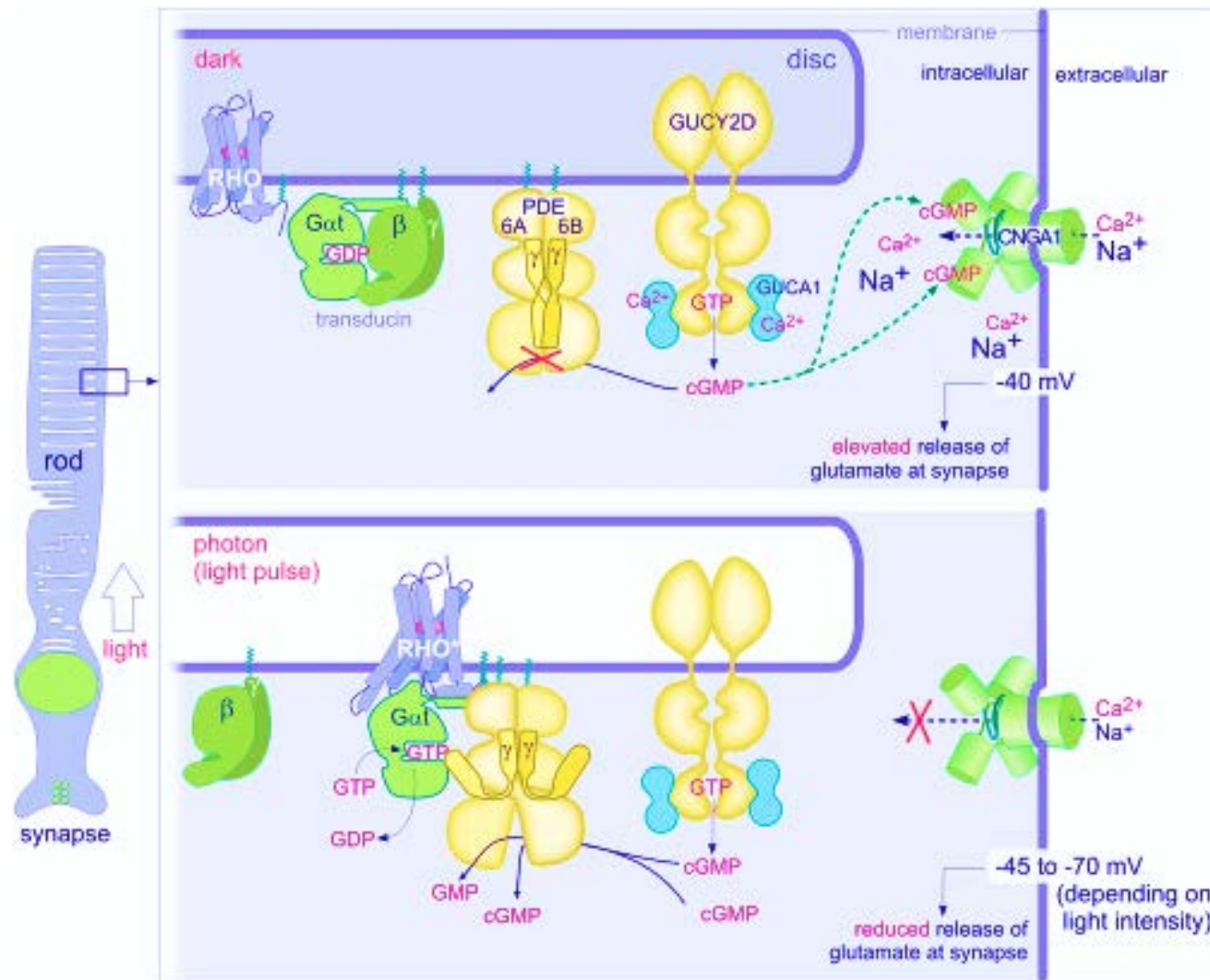
- ❑ На мутации в гене *RPE65* приходится 10% случаев наследственных дистрофий сетчатки
- ❑ В 2017 году FDA зарегистрировало первый в мире препарат генной терапии (Luxturna®) для лечения амавроз Лебера II типа с использованием аденоассоциированного вируса серотипа 2 (**AAV2-hRPE65v2**) для переноса функциональной копии гена *RPE65* в клетки пигментного эпителия сетчатки для компенсации мутации *RPE65*. Мутация в гене *RPE65*, кодирующем фермент, участвующий в регенерации светочувствительного пигмента, приводит к ранней потере зрения. Адресная доставка - субретинальная инъекция
- ❑ На мутации в гене *CEP290* приходится 20% случаев наследственных дистрофий сетчатки
- ❑ На третьей фазе клинических испытаний находится препарат Сепофарсен (QR-110) с использованием антисмысловых РНК для лечения амавроз Лебера 10 типа, вызванного мутацией в гене *CEP290*, который кодирует белок centrosомы, участвующий в формировании фоторецепторов. Мутация в гене *CE*. Адресная доставка- интравитреальная инъекция
- ❑ На второй фазе клинических испытаний находится первый *in vivo* CRISPR/Cas9 –препарат для редактирования генома (EDIT-101) с использованием аденоассоциированного вирусного вектора AAV5, несущего конструкцию CRISPR–SaCas9 для редактирования дефекта сплайсинга в гене *CEP290*. Адресная доставка - субретинальная инъекция



Мышиная модель пигментного аутосомно-рецессивного ретинита

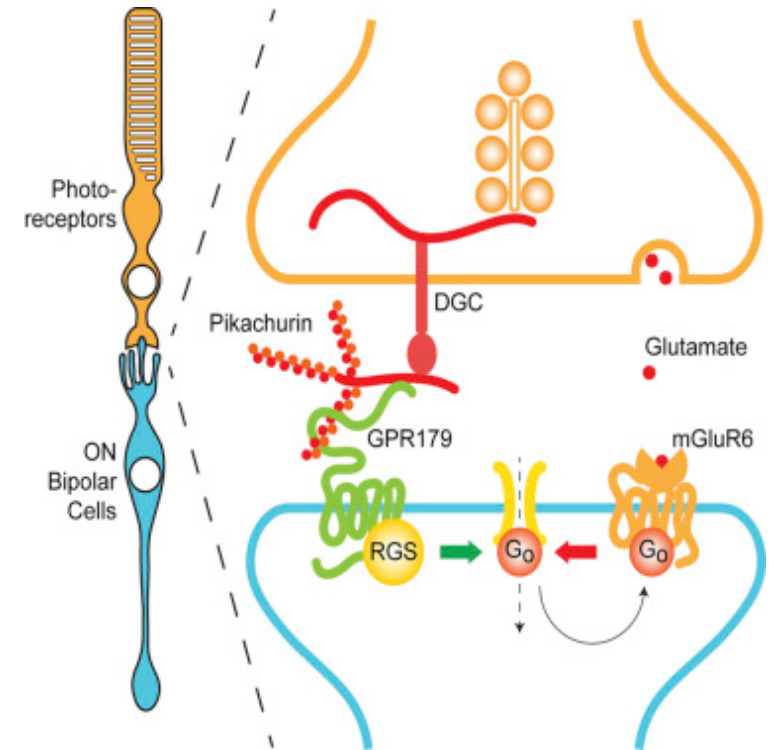
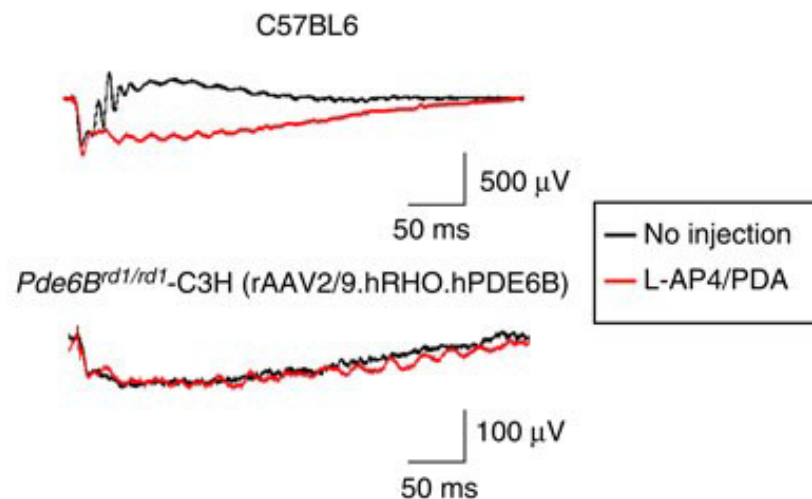
- ❑ Мышь с нокаутом гена *pde6b* - модель пигментного аутосомно-рецессивного ретинита
- ❑ Ген *pde6b* кодирует β -субъединицу фосфодиэстеразы циклического гуанидинмонофосфата (цГМФ). Отсутствие белка Pde6b приводит к постоянному открытию цГМФ-контролируемых каналов плазматических мембран фоторецепторных клеток, что приводит к неконтролируемому притоку кальция и активации апоптоза.

❑ Номер патента: 2022102975



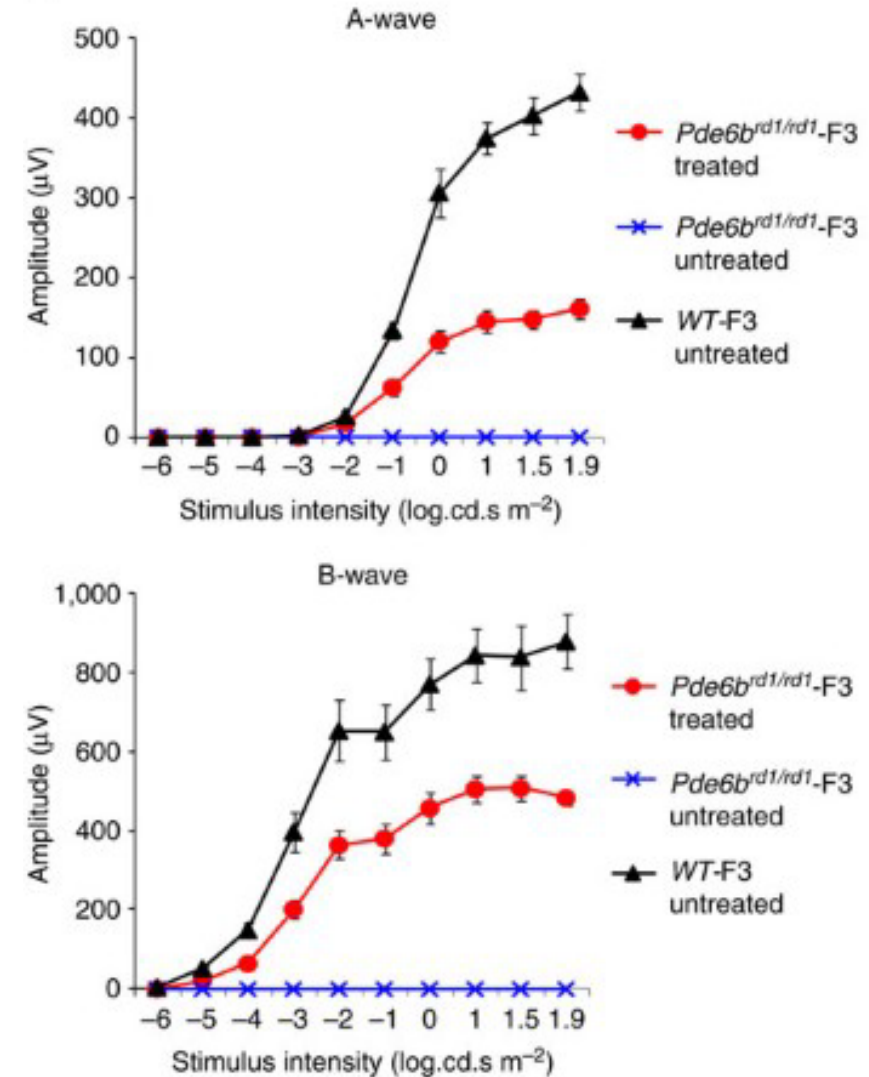
Неудача генной терапии у мышей C3H-rd1 после введения гена *pde6b* в составе AAV вызвана дополнительной мутацией *Gpr179*.

- ❑ Линии мышей C3H с мутацией *rd1* - модель аутосомно-рецессивного ретинита человека.
- ❑ Генная терапия на этой линии мышей не сработала. После введения rAAV2/9.hRHO.hPDE6B фоторецепторы не разрушились, восстановились опосредованные фоторецепторами *a*-волны, но не восстановились опосредованные биполярными клетками *b*-волны (doi.org/10.1038/ncomms7006).
- ❑ Наблюдается отсутствие *b*-волны после введения препарата L-AP4/PDA, который блокирует синаптическую передачу между фоторецептором и биполярными клетками.

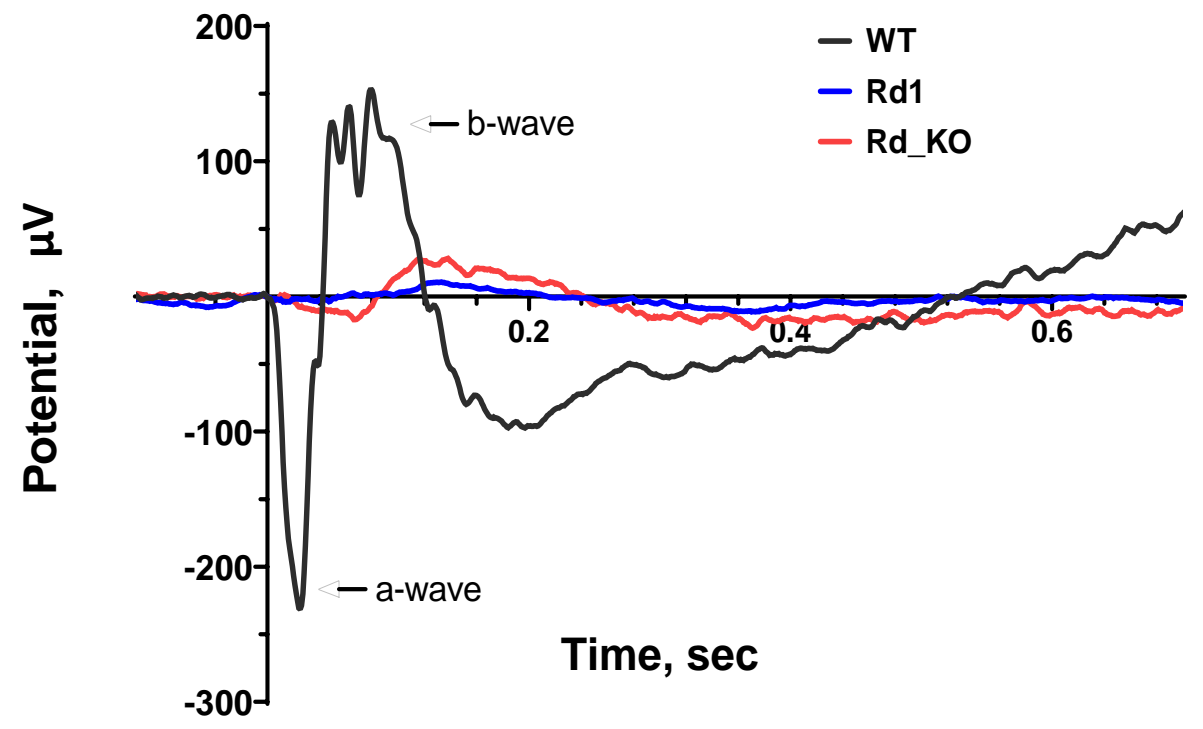
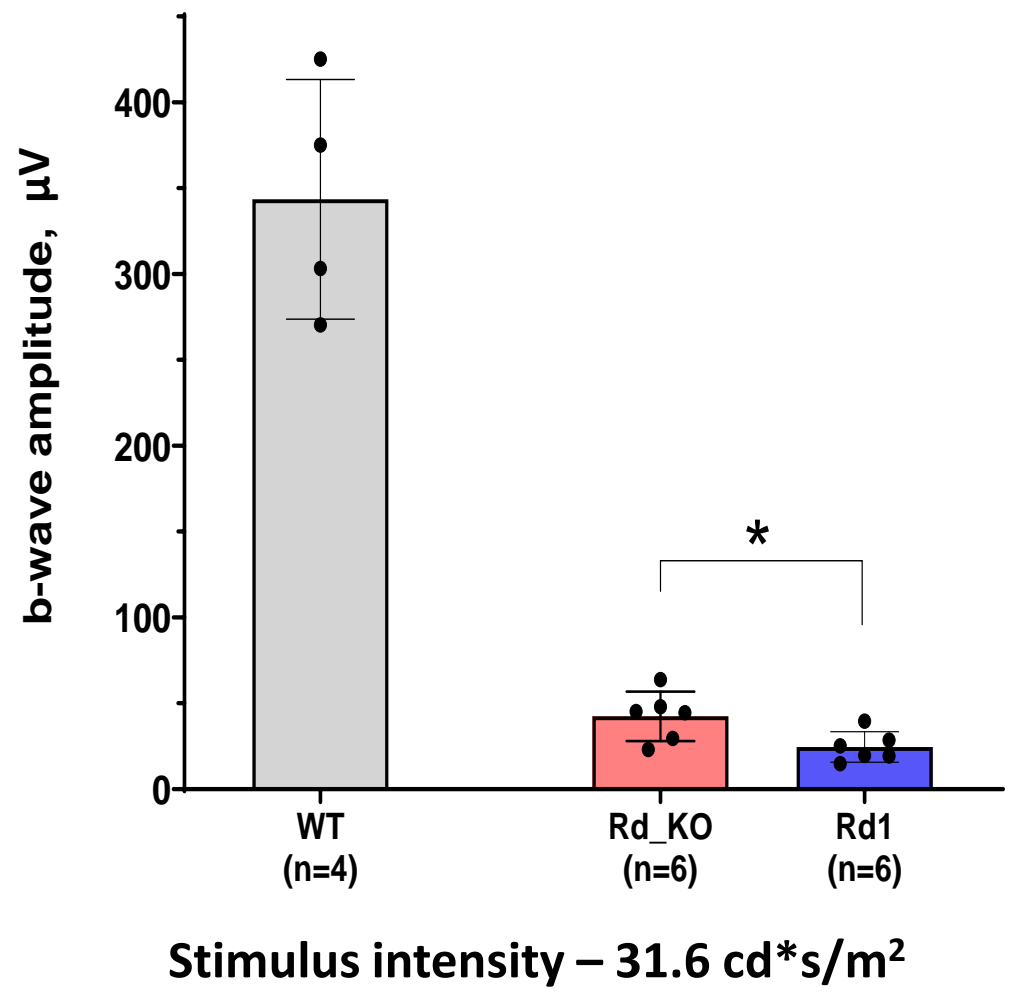


Генная терапия восстанавливает зрение у мышей C57Bl/6-rd1, у которых нет мутации в гене *Gpr179*

- Реакцию фоторецепторов можно оценить с помощью метода регистрации электроретинограммы, позволяющего рассчитать амплитуду и время до пика двух основных волн, а-волны и b-волны. Нисходящая а-волна отражает первоначальную реакцию фоторецепторов, палочек и колбочек, на световой стимул. Восходящая b-волна является мерой реакции нижележащих нейронов сетчатки, в первую очередь, биполярных клеток, на стимуляцию фоторецепторов.

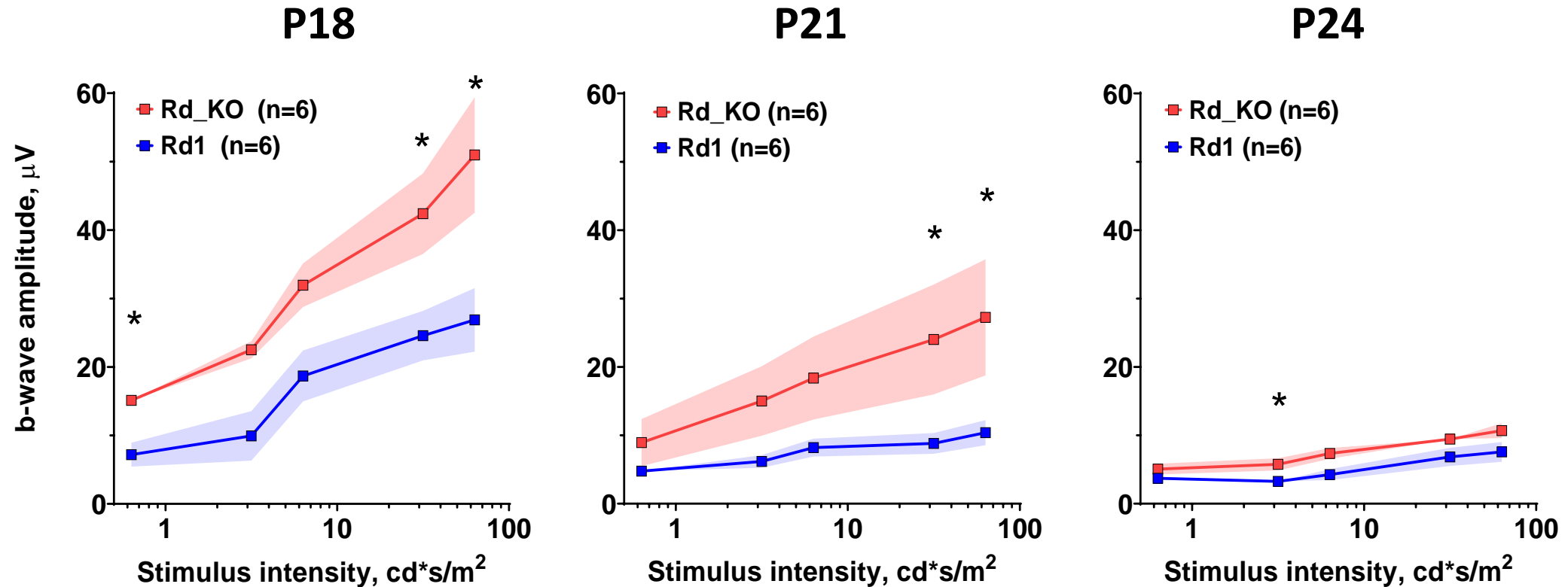


Сравнение амплитуд волн у мышей Pde6b_KO и rd1 на 18-й день постнатального периода показало, что фотоответ у обеих линий снижен по сравнению с диким типом.



* - статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p < 0.05$).

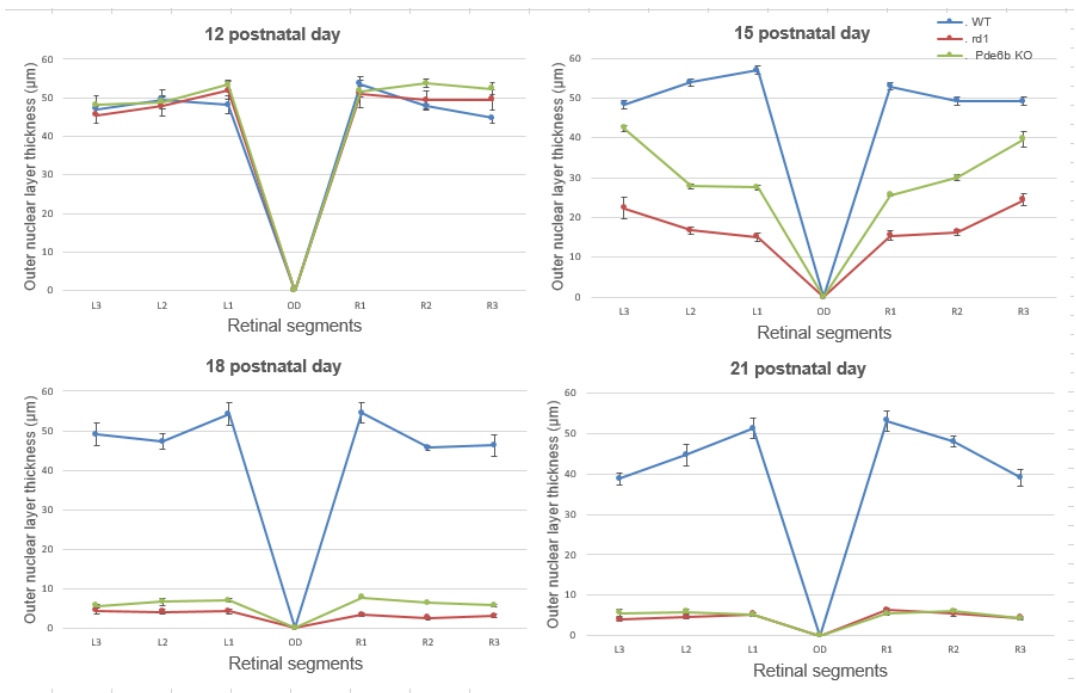
Сравнение амплитуд b-волн у мышей *Pde6b*_KO и rd1 на 18-й, 21-й и 24-й дни постнатального периода показало, что у *Pde6b*_KO фотоответ выше, чем у модели rd1.



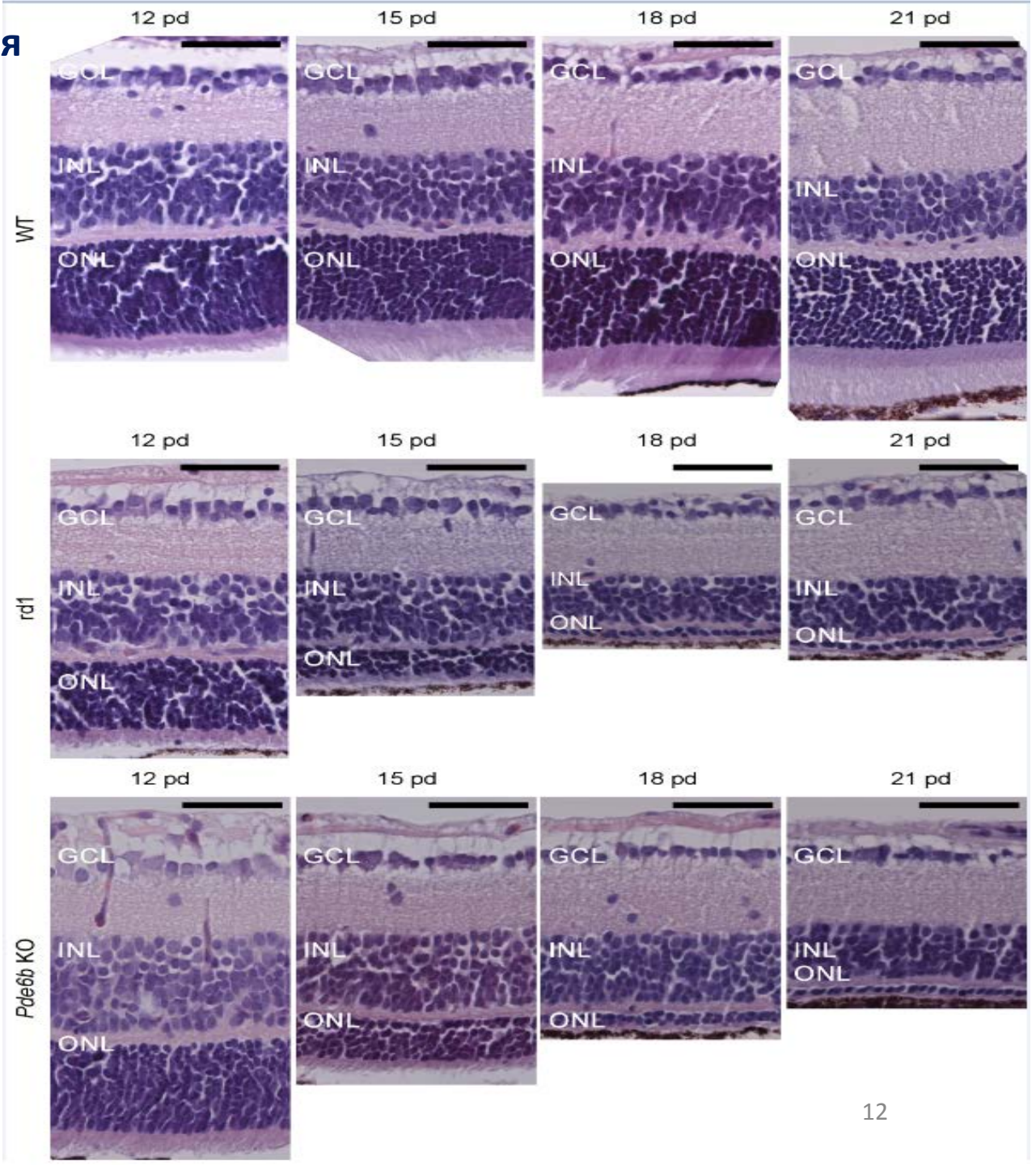
* статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p < 0.05$).

В моделях rd1 и Pde6b_KO на 15 день резко снижается толщина центральных частей сетчатки

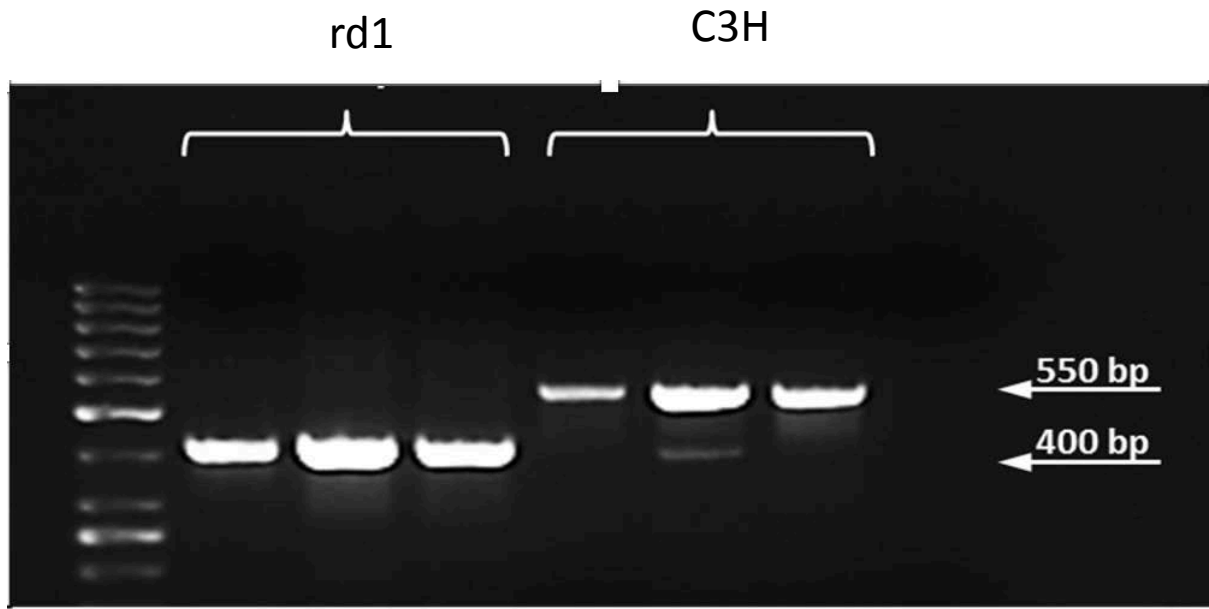
Толщина наружного ядерного слоя сетчатки мышей дикого типа, мышей rd1 и Pde6b_KO на 12, 15, 18 и 21 день постнатального возраста.



- ONL - Внешний ядерный слой: Фоторецепторы: палочки и колбочки
- INL - Внутренний ядерный слой: Биполярные клетки
- GCL - Ганглиозные клетки

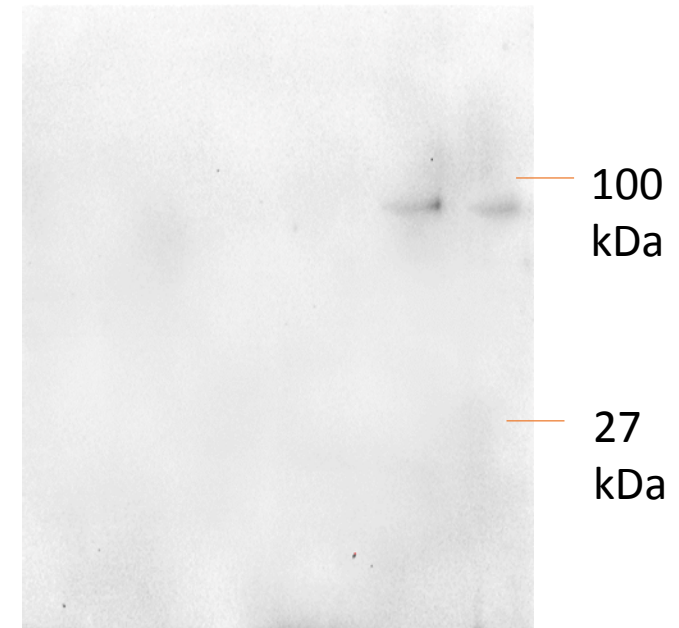


В наших мышинных моделях rd1 и Pde6b_KO мутация в гене *Gpr179* отсутствует



- ❑ ПЦР анализ не выявил мутации в гене *Gpr179* в rd1 мышах
- ❑ Анализ секвенирования ПЦР фрагментов подтвердил отсутствие мутации в гене в гене *Gpr179* в rd1 мышах

21 12 21 12 21 12
KO KO rd1 rd1 WT WT



- ❑ Вестерн-блоттинг подтвердил отсутствие белка Pde6b в в обеих моделях.

Благодарности

Центр трансгеноза и
редактирования генома СПбГУ



Ангелина В.Чиринская Елена И. Леонова
Юлия В. Сопова

Кафедра цитологии
и гистологии СПбГУ



Любовь А. Ткаченко

Лаборатория эволюции органов чувств
ИЭФБ РАН



Александр Ю. Ротов



Михаил Л. Фирсов



Санкт-Петербургский
государственный университет

Спасибо за внимание!