## МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

### имени М.В. ЛОМОНОСОВА

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра эмбриологии

Корчивая Елена Станиславовна

# ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ КОЛЛАГЕНА VII ТИПА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМ БУЛЛЕЗНЫМ ЭПИДЕРМОЛИЗОМ ДИСТРОФИЧЕСКОГО ТИПА

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель:

канд. биол. наук

Гурская Надежда Георгиевна

Куратор:

чл.-корр. РАН

Васильев Андрей Валентинович

## оглавление

СОК СОКРАЩЕНИИ	4
ЕНИЕ	5
Р ЛИТЕРАТУРЫ	8
Врожденный буллезный эпидермолиз	8
Классификация типов буллезного эпидермолиза	9
Молекулярные основы типов БЭ	. 10
Строение кожи	.13
Дермо-эпидермальное соединение	. 15
Основные структурные белки дермо-эпидермального соединени	я
	. 16
Коллагены	. 19
Коллаген VII типа	. 20
Мутации в гене <i>col7a1</i> , кодирующем коллаген VII	. 23
Участие коллагена VII в процессах биологии развития	. 28
Современные методы лечения РДБЭ	. 34
ЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	.40
Объект исследования	.40
Белковый вестерн-блот	.40
Получение кДНК	.43
ПЦР на матрице кДНК и геномной ДНК	.44
Электрофорез в агарозном геле	.46
Клонирование ПЦР-продуктов (лигирование)	.46
Химическая трансформация компетентных клеток E. coli	.47
	<ul> <li>Сок сокращении</li> <li>ЕНИЕ</li> <li>Р ЛИТЕРАТУРЫ</li> <li>Врожденный буллезный эпидермолиз</li> <li>Классификация типов буллезного эпидермолиза</li> <li>Молекулярные основы типов БЭ</li> <li>Строение кожи</li> <li>Дермо-эпидермальное соединение</li> <li>Основные структурные белки дермо-эпидермального соединени</li> <li>Коллагены</li> <li>Коллагены</li> <li>Коллаген VII типа</li> <li>Мутации в гене <i>col7a1</i>, кодирующем коллаген VII</li> <li>Участие коллагена VII в процессах биологии развития</li> <li>Современные методы лечения РДБЭ</li> <li>ЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</li> <li>Объект исследования</li> <li>Белковый вестерн-блот</li> <li>Получение кДНК</li> <li>и геномной ДНК</li> <li>Электрофорез в агарозном геле</li> <li>Химическая трансформация компетентных клеток Е. coli</li> </ul>

8. ПЦР-скрининг
9. Ночная культура клеток 49
10. Выделение плазмидной ДНК 49
11. Спектрофотометрия50
12. Секвенирование по Сэнгеру50
13. Криотомия
14. Иммуногистохимическое окрашивание
15. Конфокальная микроскопия и обработка изображений52
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ53
<ol> <li>Результаты ПЦР с кДНК больных с РДБЭ d1, d2 и здорового донора d118.</li> </ol>
2. Анализ результатов секвенирования
2.1 Результаты секвенирования для больного da3
2.2 Мутация в 4 экзоне <i>col7a1</i> da3
2.3 Результаты секвенирования для больного d160
3. Анализ сплайсинга для больного d262
4. Анализ распределения и интенсивности экспрессии структурных
белков кожи
5. Результаты белкового иммуноблоттинга Western Blot70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ72
ВЫВОДЫ73
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ74

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- (В)БЭ врожденный буллезный эпидермолиз
- (Р)ДБЭ (рецессивный) дистрофический буллезный эпидермолиз
- БМ базальная мембрана
- ВКМ внеклеточный матрикс
- ЭПР эндоплазматический ретикулум
- NGS next generation sequencing
- МСК мезенхимные стромальные клетки
- ИПСК индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- кДНК кодирующая ДНК
- ПСК преждевременный стоп-кодон
- NMD nonsense-mediated mRNA decay

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – это группа редких наследственных генодерматозов, проявляющихся в труднозаживающих эрозиях на коже и слизистых оболочках в ответ на незначительное механическое воздействие. Врожденный БЭ включает в себя 4 основных типа и более 30 форм (Murrell 2009). Развитие буллезного эпидермолиза связано с мутациями 19 генов, кодирующих дермо-эпидермального белки соединения. Наиболее тяжелый тип БЭ. рецессивный дистрофический БЭ (РДБЭ), вызван мутациями в гене col7a1, кодирующем основной белок якорных фибрилл - коллаген VII. Якорные фибриллы являются компонентом внеклеточного матрикса и соединяют дерму с кожной базальной мембраной. При РДБЭ отслоение кожи происходит между базальной мембраной и дермой. Коллаген VII является важным белком в развитии организма. Он синтезируется в дермальных фибробластах и эпидермальных кератиноцитах и секретируется во внеклеточный матрикс, где образует якорные фибриллы. Помимо участия в формировании структуры кожи и слизистых пищеварительного тракта и дыхательных путей (Evans et al. 2010; J. Fine, Johnson, et al. 2008), коллаген VII играет важную роль в эпителиомезенхимных взаимодействиях даже при закладке зубов (Umemoto et al. 2012). Было показано, что коллаген VII участвует в активации провоспалительного каскада TGFb в процессах воспаления и регенерации кожи (Naso, Uitto, and Klement 2003) и выполняет сигнальную функцию при иммунном ответе (Nyström et al. 2018).

Генетический недостаток коллагена VII приводит к врожденному РДБЭ, и вызывает сопутствующие нарушения в развитии разных систем органов, которые закладываются и начинают проявляться еще в эмбриональном периоде (Liao et al. 2018). Так, больные РДБЭ часто имеют врожденную иммунную дисфункцию (Nyström et al. 2018), а пост-натальное развитие в результате аберрантной регенерации часто связано с развитием хронического воспаления на месте эрозий кожи, нарушения эмали зубов, развитием фиброзов, в том числе

псевдосиндактилии (Boltzmann et al. 2015) и плоскоклеточного рака кожи (Knaup et al. 2011).

Сложная структура и большой размер белка коллагена VII связаны с его функциями. многочисленными Синтезированная В эндоплазматическом ретикулуме фибробластов альфа-цепь имеет строгую доменную структуру, позволяющую взаимодействовать с разными молекулами адгезии, а глицинбогатая последовательность цепи способствует объединению трех альфа-цепей в тройную спираль - проколлаген. Зрелая якорная фибрилла состоит из «сшитых» между собой многочисленных димеров проколлагена (Chung and Uitto чрезвычайно длинным геном со сложной GC-богатой 2011). Будучи последовательностью, ген *col7a1* подвержен мутациям, которые приводят к проявлениям РДБЭ (Kern et al. 2006). Мутации могут изменять синтез альфацепи, проколлагена, влиять на стабильность белка или на более тонком уровне нарушать процессы сплайсинга и трансляции. Мутации, рассматриваемые в данной работе, являются мутациями сайтов сплайсинга, что всегда вызывает сильные патологии (Richards et al. 2015). Как правило, в результате неправильного сплайсинга образуется дефектный транскрипт мРНК, при трансляции с которого синтезируются белки с нарушенной структурой и функциями, а в некоторых случаях трансляции вообще не происходит из-за образования преждевременного стоп-кодона и деградации мутировавшей мРНК (Lykke-Andersen, Shu, and Steitz 2000). Подтверждение и изучение таких мутаций, выявление механизма их влияния на синтез белка лежит в основе разработки точных методов для восстановления экспрессии коллагена VII при лечении врожденного РДБЭ.

Цель данной работы: подтвердить специфические мутации гена col7a1 в первичных культурах клеток больных врожденным дистрофическим буллёзным эпидермолизом рецессивного типа (РДБЭ) и установить механизмы их влияния на патогенез БЭ.

## Задачи:

- 1. Подтвердить данные NGS о специфических мутациях гена *col7a1*, кодирующего коллаген VII, у больных врожденным РДБЭ.
- 2. Выявить механизм нарушения экспрессии коллагена VII в клетках больных РДБЭ в результате мутаций.
- 3. Выявить изменения экспрессии структурных белков дермоэпидермального соединения в коже больных врожденным БЭ.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1. Врожденный буллезный эпидермолиз

Врожденный буллезный эпидермолиз (БЭ) (epidermolysis bullosa) — это гетерогенная группа редких наследственных заболеваний, характеризующихся хрупкостью кожи и слизистых оболочек и, как следствие, образованием рецидивирующих пузырей и эрозий, которые проявляются в ответ на незначительное механическое воздействие или спонтанно (Рисунок 1) (Лыкова и др. 2018; Murrell 2009). БЭ может проявляться локально или на всем теле при рождении или в более позднем возрасте. Степень поражения кожи и слизистых оболочек, локализация пузырей и глубина их образования зависит от типа БЭ. Врожденный буллезный эпидермолиз включает в себя более 30 различных форм. Развитие дефектов кожи обусловлено более 1500 различными мутациями в генах. кодирующих структурные белки кожи, отвечающие 3a внутриэпидермальные и дермоэпидермальные связи. Такими белками являются белки кератиновых волокон, адгезионных контактов, десмосом, гемидесмосом, в том числе якорных фибрилл в коже и слизистых (Laimer and Bauer 2015). В результате мутаций генов и изменения структуры белков происходит нарушение соединения между клетками эпидермиса и дермы, что приводит к хрупкости кожи.



Рисунок 1. Клинические проявления дистрофического типа БЭ у однояйцевых близнецов. У близнеца с более тяжелыми проявлениями (слева) показаны обширные поражения кожи, а близнец с более легким течением болезни (справа) имеет локализованные эрозии на кистях рук, локтях и коленях (Odorisio et al. 2014).

Буллезный эпидермолиз относят к группе редких генодерматозов. Распространенность форм БЭ варьируется и составляет от 3 до 20 случаев на 1 млн населения в разных популяциях и типах БЭ. Продолжительность жизни больных зависит от медицинского ухода и степени тяжести болезни. Данные о больных врожденным буллезным эпидермолизом накапливаются в различных базах данных, а информация о больных наиболее тяжелым дистрофическим типом собрана в международной ассоциации больных буллезным эпидермолизом дистрофического типа, DEBRA (Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association).

#### 2. Классификация типов буллезного эпидермолиза

БЭ высоковариабилен, и у больных встречаются как локализованные формы с поражениями отдельных участков тела, так и обширные быстро

прогрессирующие поражения, вовлекающие многие другие системы органов. При тяжелых формах возможны канцерогенез, задержка развития и роста.

На основании генетических и иммунологических исследований на данный момент врожденный БЭ разделяют на 4 основных типа в зависимости от **уровня поражения** эпидермиса и дермы, возникающего вслед за механической травмой кожи: <u>простая, пограничная, дистрофическая форма и с 2008 года отдельно</u> <u>выделяют синдром Киндлер</u>, характеризующийся дезинтеграцией на разных уровнях эпидермиса одновременно. Каждый тип охватывает множество клинических проявлений разной степени тяжести от незначительных поражений до летальных случаев.

#### 3. Молекулярные основы типов БЭ

Bce формы БЭ имеют характерные внешние проявления И преимущественно вызваны мутациями в разных структурных генах, что определяет тип БЭ. На данный момент известно порядка 19 генов, мутации в которых вызывают различные формы БЭ. Тип наследования любой из форм БЭ может быть как аутосомно-рецессивным, так и аутосомно-доминантным. Тип и число мутаций, их расположение в гене также приводят к значительной гетерогенности клинических проявлений. Белки, гены которых подвержены мутациям у больных БЭ, выполняют разные функции, но их объединяет то, что все они являются структурными белками и обеспечивают прочную связь слоев кожи друг с другом. В зависимости от того, в каком слое кожи образуются пузыри и в каких генах произошла мутация, буллезный эпидермолиз делят на 4 типа (*Рисунок 2*).

Так, при буллезном эпидермолизе **простого** типа происходит расслоение базального и супрабазального (глубокая часть шиповатого слоя) слоев эпидермиса из-за лизиса кератиноцитов, при этом пузыри образуются в верхних слоях эпидермиса (J. D. Fine et al. 2000). Простой БЭ связан с мутациями в генах, кодирующих белки верхних слоев эпидермиса, кератин-5 (*krt5*) и -14 (*krt14*), плектин (*plec*), а также десмоплакин (*dsp*) плакофилина-1 (*pkp-1*), плакоглобин (*jup*) (Laimer and Bauer 2015).

Пограничный БЭ затрагивает светлую пластинку (lamina lucida) базальной мембраны, находящуюся на границе эпидермиса и дермы (J. D. Fine et al. 2000). Данный тип обусловлен мутациями в генах, кодирующих три полипептидные цепи  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3,  $\gamma$ 2 белка ламинина-332 (*lama3, lamb3, lamc2*), интегрина  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 (*itga6, itgb4*) и коллагена XVII типа (*col17a1*) (Laimer and Bauer 2015).

Дистрофический тип БЭ характеризуется мутациями в гене, кодирующем белок коллаген VII типа (*col7a1*) – компонент якорных фибрилл сосочкового слоя дермы. Пузыри образуются под плотной пластинкой (lamina densa) базальной мембраны (Laimer and Bauer 2015).

Синдром Киндлер характеризуется дезинтеграцией на разных уровнях эпидермиса и дермы одновременно и обусловлен мутациями в гене *fermt1*, кодирующем киндлин-1 (*KIND1*) (Laimer and Bauer 2015).

Дистрофический тип БЭ – одна из наиболее тяжелых форм БЭ, связан с более 600 различными мутациями в гене *col7a1*, который кодирует коллаген VII – основной структурный белок якорных фибрилл базальной мембраны (Res, Uitto, and Christiano 1994).



Рисунок 2. Схематическое изображение системы белков зоны кожной базальной мембраны. Стрелками показаны белки, мутации в которых приводят к различным формам БЭ (McGrath and Uitto 2012)

У больных с простым БЭ с возрастом часто клиническая картина улучшается, и можно предположить, что происходит компенсация другими структурными компонентами. Выживаемость новорожденных заметно снижена при пограничном и дистрофическом БЭ. При двух последних типах часто развиваются осложнения, трудно поддающиеся лечению, что также является причиной преждевременной смерти у этих больных.

#### 4. Строение кожи

Различные формы буллезного эпидермолиза возникают вследствие расслоения ткани в разных слоях кожи, что отражено в классификации БЭ. Кожу человека выделяют в отдельный, самый большой по площади в организме, орган из-за функциональной значимости и структурных особенностей. Кожа является самым большим по площади органом человека и достигает 2,5 м<sup>2</sup>. Строение кожи отражает сложность ее функций, заключающихся в поддержании температуры тела, создании защитного барьера организма от ультрафиолетовых лучей и физических воздействий, депонировании крови, выведении продуктов обмена в виде пота, рецепторной и дыхательной функциях, а также ее активной роли в иммунной системе (Быков 1997). Так, выполняя защитную функцию, клетки наружного слоя кожи – эпидермиса – прочно связаны между собой и практически не имеют межклеточного матрикса. Они богаты белком кератином, который участвует в ороговевании верхнего слоя, контактирующего с внешней средой. Рецепторные, терморегуляторные и иммунные функции кожа выполняет благодаря дерме, богатой внеклеточным матриксом, сосудами, рецепторами и различными клеточными и белковыми компонентами. Терморегуляторная функция осуществляется за счет подкожной жировой клетчатки.

Таким образом, кожа человека состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной жировой клетчатки (*Рисунок 3*). Между эпидермисом и дермы лежит кожная базальная мембрана.



Рисунок 3. Строение и клеточный состав кожи (Nestle et al. 2009).

Эпидермис представлен многослойным плоским ороговевающим эпителием, состоит в основном из кератиноцитов и, как правило, достигает 0,05-0,1 мм в толщину. Эпидермис включает пять слоев кератиноцитов и образуется путем пролиферации кератиноцитов в нижнем базальном слое, расположенном на базальной мембране (БМ). Базальный слой содержит клетки, которые непрерывно дифференцируются и перемещаются к поверхности, образуя вышележащие шиповатый, зернистый, блестящий и роговой слои. При продвижении к вышележащим слоям кератиноциты уплощаются и приобретают гранулы роговых и липидных веществ для обеспечения барьерных и защитных функций эпителия (Быков 1997). Помимо кератиноцитов эпидермис содержит меланоциты, макрофаги (клетки Лангерганса) и осязательные клетки Меркеля (McGrath and Uitto 2012). Кератиноциты связаны друг с другом с помощью десмосом, а с базальной мембраной – с помощью полудесмосом.

Дерма – соединительнотканная часть кожи толщиной от 0,5 мм до 5 мм, осуществляющая трофическую и опорную функцию для эпидермиса. Эпидермис прикрепляется к дерме с помощью сложной сети белков и гликопротеинов базальной мембраны. Важнейшие клетки дермы – дермальные фибробласты. Дерма состоит ИЗ двух слоев: сосочковый и сетчатый. Сосочковый (папиллярный) слой состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани, лимфатических и кровеносных капилляров, нервных окончаний и при помощи эластических волокон (не более 4% ВКМ (внеклеточного матрикса) дермы) и якорных фибрилл обеспечивает связь дермы с базальной мембраной. Более глубокий сетчатый слой – ретикулярный – образован плотной волокнистой соединительной тканью ИЗ трехмерной сети коллагеновых волокон, взаимодействующих с компонентами папиллярного слоя дермы. Дерма содержит также ряд неколлагеновых молекул, которые тоже участвуют в клеточной адгезии между эпидермисом и дермой (McGrath and Uitto 2012).

Дермальные фибробласты и базальные кератиноциты синтезируют и откладывают компоненты дермо-эпидермального соединения (Marinkovich et al. 1993).

#### 5. Дермо-эпидермальное соединение

Между эпидермисом и дермой находится дермо-эпидермальное соединение – зона базальной мембраны, состоящая из макромолекул внеклеточного матрикса (J. Fine 1991; Uitto and Pulkkinen 1996). Ее функции – это участие в регенерации тканей, создание селективного и физического барьера между клетками, установление полярности клеток и присоединение эпидермиса к дерме (Briggaman and Wheeler 1975). Кожная БМ имеет толщину около 80 нм и состоит из двух слоев разной электронной плотности: светлой пластинки (lamina lucida), прилежащей к эпидермису, и плотной пластинки (lamina densa) со стороны дермы, каждая толщиной 40 нм (Ray and Gately 2004). Верхний слой (светлая пластинка) примыкает непосредственно к плазматической мембране

базальных кератиноцитов. Плотная пластинка взаимодействует с внеклеточным матриксом папиллярного слоя дермы.

Основные белки зоны БМ образуют непрерывную сеть, проходящую от цитоплазмы базальных кератиноцитов через тонофиламенты гемидесмосом сквозь плазматическую мембрану (lamina lucida и lamina densa) и дермоэпидермальную базальную мембрану и далее простирающуюся к верхней сосочковой дерме через мембрану lamina fibroreticularis. Суббазальная мембрана lamina fibroreticularis подстилает плотную пластинку БМ и состоит из фибриллярных структур, таких как якорные фибриллы, микрофибриллы и коллагеновые фибриллы. Якорные фибриллы одним концом закреплены в плотной пластинке и дистальным концом проникают в сосочковый слой дермы, закрепляясь в ней в областях электронно-плотного материала («якорных бляшках») (Ray and Gately 2004). Крепление якорных фибрилл к дерме способствует адгезии слоев кожи. Таким образом, тонкая структура дермоэпидермального соединения демонстрирует высокую организацию мембран, которые стабилизируются гемидесмосомами со стороны эпидермиса и якорными фибриллами со стороны дермы (Res, Uitto, and Christiano 1994).

#### 6. Основные структурные белки дермо-эпидермального соединения

Биохимические компоненты описанных выше структур дермоэпидермального соединения синтезируются в базальных кератиноцитах и дермальных фибробластах, которые способствуют формированию и репарации базальной мембраны (Ghalbzouri et al. 2005).

Кератиноциты связаны с базальной мембраной с помощью полудесмосом (гемидесмосом). По составу гемидесмосомы бывают двух типов. Первые содержат белки интегрин α6β4, плектин, CD151b (тетраспанин), BP180 (коллаген XVII). Второй тип, гемидесмосомы слизистой кишечника, не BP180. Гемидесмосомы соединяются содержит с кератиновой сетью филаментов (кератины 5 14) промежуточных И через плектин,

ассоциированный с бляшкой на внутренней поверхности плазматической мембраны (внутренняя и наружная электронно-плотные бляшки 20-40 нм). От бляшки плазматической мембраны в светлую пластинку базальной мембраны идут якорные филаменты, состоящие из интегрина абβ4, ламинина-332 (ламинина-5) и BP180 (McGrath and Uitto 2012). Ламинин-5 является важным компонентом обеих пластинок БМ. Через взаимодействие с интегриновыми рецепторами он участвует в адгезии кератиноцитов к БМ (Kim B. Yancey 1995). Соединенные дисульфидными мостиками ламинины 5 и 6 найдены в якорных филаментах светлой пластинки, и эта область обеспечивает адгезию к плотной пластинке (lamina densa).

Главным компонентом плотной пластинки БМ является коллаген IV, способствующий поддержанию структуры плотной пластинки. Плотная пластинка связана с дермой U-образными якорными фибриллами, состоящими из коллагена VII. В слоях дермы якорные фибриллы взаимодействуют с якорными бляшками, коллагеном I и III, другими компонентами дермы (*Pucyhok 4*,

*Таблица* 1) (Briggaman and Wheeler 1975; McGrath and Uitto 2012). В числе химических компонентов зоны БМ также есть различные протеогликаны (гепаринсульфатпротеогликан), фибронектины.

Дермальные фибробласты и базальные кератиноциты синтезируют и откладывают компоненты зоны базальной мембраны, включая коллаген VII. Эмбриональные кератиноциты в первичных культурах обладают стимулирующим действием на биосинтез коллагена VII в фибробластах для формирования базальной мембраны на ранних стадиях развития. Вероятно, что повышенный синтез определенных цитокинов, например, TGF-b, обуславливает синтез коллагена VII обоими типами клеток (Marinkovich et al. 1993).

Нарушения в экспрессии белков дермо-эпидермального соединения приводят к развитию буллезного эпидермолиза (*Рисунок 1, Рисунок 2*).



Рисунок 4. Схематическое изображение молекулярных взаимодействий в зоне кожной базальной мембраны. Компоненты отмечены цветом, БПАГ – буллезный пемфигоидный антиген (McGrath and Uitto 2012).

Таблица 1. Молекулярные компоненты дермо-эпидермального соединения (McGrath and Uitto 2012).

Базальные	Бляшка	Трансмем-	Компонен-	Компонен-	Якорные
кератино-	крепления	бранные	ты Lamina	ты lamina	фибрил-
циты	гемидесмо-	компонен-	lucida и	densa	лы
	сомы	ты	lamina densa		
Кератин 5	230-kDa	Коллаген	Ламинин-	Коллаген	Коллаген
Кератин 14	буллезный	XVII	332 (5)	IV	VII
	пемфигоид-	Коллаген	Ламинин	Ламинин	GDA-
	ный антиген	XIII	311 (6)	111 (1)	J/F3
	(BP230)				. •
	``´´	Интегрин	Ламинин	Нидоген	antigen
	Плектин	ы α3β1 и	511 (10)	Перлекан	
		α6β4			

#### 7. Коллагены

Молекулярные основы дистрофического типа буллезного эпидермолиза состоят в том, что вследствие мутаций в гене *col7a1* нарушается структура дермо-эпидермального соединения на уровне якорных фибрилл. В норме коллаген VII, произведенный кератиноцитами и фибробластами, образует якорные фибриллы, связывающие эпидермис и дерму, однако при РДБЭ эти процессы нарушаются (March and Reichelt 2018). Рецессивный дистрофический БЭ (РДБЭ) характеризуется устойчивыми к терапии обширными поражениями кожи, либо локализацией пузырей только на руках, ногах, коленях и сгибах тела, а также многочисленными сопутствующими осложнениями.

Коллагены – основные белковые компоненты внеклеточного матрикса в большинстве тканей позвоночных, из которых по меньшей мере 12 коллагенов экспрессируются в коже (до 45% от общего количества белка в организме и до 85% от сухого веса дермы). Семейство коллагенов содержит 29 генетически различных белков.

Коллагены образуют фибриллы, которые входят в состав ВКМ тканей. Характерной структурной особенностью всех коллагенов является наличие тропоколлагена (проколлагена) - тройной левозакрученной спирали из трех полипептидных альфа-цепей, которая обеспечивает стабильность этих структурных молекул, что обеспечивает прочность соединительной ткани. Сборка альфа-цепей в спираль определяется аминокислотными повторами Gly-Х-У в их первичной последовательности. В некоторых коллагенах, например, в типах VI (компонент базальной мембраны) и VII (компонент якорных фибрилл), повторы Gly-X-Y имеют дефекты, что прерывает спиральную конформацию тропоколлагена, обеспечивая в дальнейшем гибкость молекул. Кожа человека содержит коллагены, играющие важную роль в обеспечении прочности и стабильности кожи, одним из которых является главный компонент якорных фибрилл, коллаген VII (Chung and Uitto 2011).

#### 8. Коллаген VII типа

Коллаген VII является необычно длинной белковой молекулой с 1530аминокислотным центральным трехспиральным доменом, фланкированным неколлагеновыми последовательностями. Gly-X-Y последовательность в коллагене VII часто прерывается вследствие 19 ошибок (вставок или делеций) в последовательности повторов. В середине трехспирального домена существует 39-аминокислотная неколлагеновая «шарнирная» последовательность, подверженная протеолизу.

Амино-концевой NC-1 домен коллагена VII размером 145 кДа имеет сродство к адгезивным белкам соединительной ткани (фибронектин, фактор фон Виллебранда) и несет короткие цистеин и пролин-богатые участки. Карбоксиконцевой домен NC-2 размером 30 кДа имеет гомологию к ингибиторам протеаз (*Рисунок* 5).



Рисунок 5. Доменная структура аминокислотной последовательности альфа-цепи коллагена VII. Показано, что коллаген VII состоит из спирального центрального домена, содержащего «шарнирный» неколлагеновый участок из 39 аминокислот. Тройная спираль фланкирована амино- и карбоксиконцевыми неколлагеновыми доменами NC-1 и NC-2, имеющими гомологию к адгезивным белкам и ингибитору протеазы (Chung and Uitto 2011).

Ген коллагена VII типа col7a1 расположен на коротком плече 3 хромосомы, имеет сложную структуру и состоит из 118 экзонов, что значительно больше, чем у всех ранее известных генов (Christiano et al. 1994). Размер гена col7a1 составляет 30,5 кб. Несмотря на это структура гена и первичная последовательность белка эволюционно устойчивы, что говорит о важности коллагена VII как структурного белка (Kivirikko et al., 1996). Экспрессия col7a1 характерна для клеток эпителия: эпидермальных кератиноцитов и дермальных фибробластах, где присутствие белка коллагена VII связано с образованием якорных фибрилл (March and Reichelt 2018; Burgeson 1993; Marinkovich et al. 1993). В эмбриональном периоде при образовании базальной мембраны кератиноциты способны стимулировать синтез коллагена VII в фибробластах. На транскрипционном уровне экспрессия регулируется TGF-b сигналингом (Knaup et al. 2011).

Якорные фибриллы выполняют функцию прикрепления эпидермиса к дерме в дермо-эпидермальном соединении кожи и слизистых. В коже человека они пролегают от якорных бляшек плотной пластинки кожной БМ к сосочковому слою дермы, где образуют сеть с компонентами соединительной ткани.



Рисунок 6. Фибробласт, окруженный якорными фибриллами. Якорные фибриллы формируются из коллагена VII, синтезируемого ЭПР фибробластов (Ploetz, Zycband, and Birk 1991).

Короткие полипептиды коллагена VII синтезируются внутриклеточно на кератиноцитов фибробластов рибосомах И И проникают В полость эндоплазматического ретикулума (ЭПР), образуя длинные альфа-цепи. В ЭПР происходят многочисленные модификации цепей. После синтеза длинных полипептидных альфа-цепей коллагена VII три альфа-цепи соединяются Сконцевыми доменами и образуют тройную спираль (проколлаген), которая попадает в ВКМ и после удаления части С-конца формирует антипараллельные димеры, связываясь с другими спиралями коллагена VII через N-концевые домены. Такие димеры стабилизируются дисульфидными связями и, соединяясь латерально между собой, образуют исчерченные фибриллы (Рисунок 6, Рисунок 7). Дермо-эпидермальное соединение включает большой комплекс из различных белков, в котором якорные фибриллы коллагена VII через неколлагеновые домены (NC-1) связывают с высокой афинностью основные компоненты плотной пластинки кожной базальной мембраны (ламинин-332, коллаген IV) и способны физически удерживать в своей сети дермальные коллагены I, III и V (Brittingham, Uitto, and Fertala 2006). Таким образом, якорные фибриллы прикрепляют плотную пластинку базальной мембраны к подлежащей дерме.



Рисунок 7. Схематичное представление синтеза альфа-цепей коллагена VII и сборки якорных фибрилл в норме (слева) и нарушения в сборке, приводящие к ДБЭ (справа) (Chung and Uitto 2011).

### 9. Мутации в гене col7a1, кодирующем коллаген VII

Учитывая структурную сложность гена *col7a1*, доменную структуру белка коллагена VII и важное значение доменов в макромолекулярных взаимодействиях, очевидно, что мутации в гене *col7a1* имеют серьезные

последствия для целостности кожи и слизистых. Последствия мутаций в *col7a1* приводят к дистрофическому типу буллезного эпидермолиза, при котором коллаген VII отсутствует полностью или формирует морфологически ненормальные якорные фибриллы. Это позволило выяснить, что причиной хрупкости кожи у большинства больных ДБЭ (дистрофическим БЭ) являются мутации в гене *col7a1* коллагена VII типа (Burgeson 1993).

Известно около 300 различных мутаций в *col7a1* (Dang and Murrell 2008; Murata et al. 2004). Дистрофическая форма буллезного эпидермолиза заболеваний, генетически разнородная группа В которой нарушения наследуются по аутосомно-доминантному или более тяжелому по клиническим проявлениям аутосомно-рецессивному типу. Широкий спектр мутаций включает возникновение преждевременного стоп-кодона (TGA, TAA, TAG) в результате миссенс- и нонсенс-мутаций, вставок, делеций, мутаций сайта сплайсинга, приводящих к сдвигу рамки считывания. Мутации в *col7a1* наблюдаются по всему гену как в экзонах, так и в интронах (Kern et al. 2006) и могут изменять синтез альфа-цепи, сборку тройной спирали коллагена VII или влиять на стабильность структур, так или иначе нарушая формирование якорных фибрилл. Выявленные корреляции между фенотипом и генотипом свидетельствуют о том, что тяжесть проявления БЭ отражает комбинации мутаций *col7a1*, последствий мутаций на уровне мРНК и белка в сочетании с эффектами генетического фона и окружающей среды (Uitto and Richard 2005).

Частыми являются мутации сайта сплайсинга, при которых изменяются инвариантные последовательности GT и AG в донорном или акцепторном сайтах сплайсинга. В норме при сплайсинге происходит вырезание из пре-мРНК некодирующих нуклеотидных последовательностей (интронов) и последующее сшивание кодирующих участков (экзонов). Рибонуклеопротеидный комплекс сплайсосома узнает 5'-донорный сайт и 3'-акцепторный сайт сплайсинга на концах интрона и участвует в его удалении (*Рисунок 8*).



Рисунок 8. Инвариантные последовательности донорного и акцепторного сайтов сплайсинга AG и GT на уровне ДНК в интронах эукариот. Схема сплайсинга.

Как правило, мутации сайтов сплайсинга приводят к образованию дефектного транскрипта мРНК в результате ошибок в сплайсинге. При трансляции с таких мРНК могут образовываться преждевременные стоп-кодоны и белок с нарушенной структурой и функциями. При сохранении важных доменов белка мутации могут приводить к более мягким эффектам с экспрессией новых изоформ белка. Мутации сайтов сплайсинга всегда являются патологическими.

В данной работе мы рассматриваем механизмы заболевания трех больных с рецессивной дистрофической формой буллезного эпидермолиза (d1, d2, da3). Все доноры имеют тяжелые клинические проявления заболевания от обширного поражения кожи до более глубоких нарушений. Здесь представлены данные об их мутациях в гене *col7a1*, полученные из первичных результатов высокопроизводительного секвенирования NGS (next generation sequencing), а также литературных источников (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристика мутаций в ДНК, полученных из фибробластов и кератиноцитов доноров d1, d2, da3 больных РДБЭ.

r	1	1	1	1
	1 аллель		2 аллель	
Донор	Экзон/интрон	Мутация в	Экзон с	Мутация в <i>col7a1</i>
	с мутацией в	col7a1	мутацией	
	col7a1			
d1	Экзон 3	c.425A>G	Экзон 3	c.425A > G (Kocher et al.
				2019)
d2	Интрон 5	c.682+1G>A	Экзон 74	c.6205C>T (Kahofer et al.
		(Hashikawa et		2003; Kakavand Hamidi et
		al. 2009)		al. 2016)
da3	Экзон 4	c.520G>A	Экзон 20	<i>c.2696-4_c.2696-delCCAG</i>

Донор 1 (d1) имеет гомозиготную мутацию сайта сплайсинга в экзоне 3 гена *col7a1*. В этом месте происходит однонуклеотидная замена аденина на гуанин (c.425A> G), что приводит к замене лизина на аргинин и нарушению сплайсинга экзона 3. Таким образом, последующее образование дефектной мРНК, вызванное мутацией, приводит к образованию преждевременного кодона терминации трансляции без сдвига рамки считывания, что привлекает интерес к данной мутации (Kocher et al. 2019). Эта мутантная аллель с миссенс-мутацией распространена среди больных РДБЭ во всей Европе (Hammami-Hauasli et al. 1997).

Донор 2 (d2) несет комбинацию двух гетерозиготных мутаций в 5 интроне и 84 экзоне *col7a1*. Миссенс-мутация в **5 интроне** также является мутацией сайта сплайсинга, происходит **замена гуанина на аденин в положении c.682+1G>A**. В результате данной мутации при сплайсинге происходит удержание интрона 5

(*Рисунок 9*). Измененная мРНК включает 5 интрон, что приводит к преждевременной терминации трансляции и нонсенс-опосредованному распаду мРНК (Kakavand Hamidi et al. 2016; Hovnanian et al. 1997).

Также d2 имеет миссенс-мутацию в 74 экзоне c.6205C>T (p.R2069C), замену цитозина на тимидин, приводящую к замене аргинина на цистеин в спиральном домене коллагена VII (Kahofer et al. 2003; Kakavand Hamidi et al. 2016), но мы не рассматриваем ее в данной работе.



Рисунок 9. Схематическое изображение эффекта мутации сайта сплайсинга с.682+1G>A col7a1 у d2. Пунктирная линия показывает удержания последовательности интрона 5 в мутантной мРНК d2 (Hovnanian et al. 1997).

Донор 3 (da3) имеет две гетерозиготные мутации в гене *col7a1*. В **4** экзоне обнаружена мутация сайта сплайсинга в положении c.520G>A в гетерозиготном состоянии, приводящая к замене глицина на аргинин (p.Gly174Arg). Мутация в 20 экзоне – новая, не опубликованная в литературе ранее, четырехнуклеотидная делеция c.2696-4\_c.2696-1delCCAG на стыке 20 экзона и 19 интрона, что добавляет значимость данной работе. Мутация такого типа определяется как герминальная патогенная, класс I по классификации ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics (Richards et al. 2015). Как правило, класса I приводят к нарушению функций гена вплоть до полного отсутствия транскрипции, однако, лабораториям предстоит выяснить влияние всех клинически значимых альтернативных форм сплайсинга.

Изучение и подтверждение генетических мутаций, лежащих в основе РДБЭ, требует специального анализа ДНК, мРНК, белка больных РДБЭ, имеет

важное значение для понимания механизмов БЭ и крайне необходимо для диагностики, прогнозирования и лечения БЭ.

#### 10. Участие коллагена VII в процессах биологии развития

Генетический недостаток белка коллагена VII непосредственно связан с вопросами биологии развития. Он вызывает врожденный РДБЭ, при этом наряду с дефектами кожи возникают нарушения формирования других систем органов, связанные с дефицитом коллагена VII, которые закладываются и начинают проявляться еще в эмбриональном периоде. Отсутствие коллагена VII у человека целый изменений, вызывает спектр охватывающих активацию провоспалительных каскадов, приводящих к хроническому воспалению и вызывающих аберрантную регенерацию, приводящую к фиброзам ткани, в частности, псевдосиндактилии (Boltzmann et al. 2015). Нарушения формирования якорных фибрилл (Рисунок 10) отражаются в развитии слизистых дыхательных и пищеварительных путей (Evans et al. 2010; J. Fine, Johnson, et al. 2008). Часто недостаток коллагена и хронические воспаления сопровождаются изменениями, онкотрансформацией, например, плоскоклеточный связанными с рак большинства больных дистрофическим буллезным развивается y после 30-летнего эпидермолизом возраста. Основы изменений этих закладываются еще до рождения (Liao et al. 2018). Однако, удивительным является тот факт, что часто люди с дистрофической формой БЭ рождаются без сильной симптоматики, патологические симптомы начинают проявляться, постепенно нарастая, после нескольких лет жизни.



Рисунок 10. Трансмиссионная электронная микроскопия дермоэпидермального соединения. На фотографии видны гемидесмосома, плотная и светлая пластинки базальной мембраны (lamina lucida, lamina densa) и якорные фибриллы. (4. Саркисов д. С. Грануляционная ткань // БМЭ. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1974-1988. — Т. 6., 1988. Т. 6)

Тяжесть воспалительных и фиброзных проявлений БЭ определяется сигнальными каскадами, в том числе определяется TGF- $\beta$  сигналингом (Odorisio et al. 2014). В здоровом организме через активацию провоспалительных цитокинов и факторов ремоделирования ткани каскад TGF- $\beta$  способствует заживлению ран (Knaup et al. 2011) и повышает уровень коллагена VII по механизму обратной связи при ослабленной клеточной адгезии в коже. TGF- $\beta$ 1 является энхансером гена *col7a1* в кератиноцитах и дермальных фибробластах (Naso, Uitto, and Klement 2003), и экспрессия коллагена регулируется TGF-b на транскрипционном уровне (Ryynänen et al. 1991). В норме коллаген VII находится в комплексе с тромбоспондином-1, однако дефицит коллагена приводит к высвобождению тромбоспондина-1 и активации TGF- $\beta$  (*Pucyнок 11*) (Atanasova et al. 2019).



Рисунок 11. Механизм активации TGF-b через тромбоспондин-1 в коже с РДБЭ. В здоровой коже тромбоспондин-1 и коллаген VII связаны в комплексе. При недостатке коллагена VII у РДБЭ тромбоспондин-1 высвобождается в ВКМ и вытесняет лиганд TGFb-рецептора из латентного комплекса с последующим связыванием TGFb с рецептором на поверхности клетки и активацией сигналинга (Atanasova et al. 2019).

При продолжительном воздействии, например, при хронических воспалениях при РДБЭ, оверэкспрессия TGF-β в комплексе с дополнительными нарушениями может привести к развитию и прогрессированию фиброзов, а затем к плоскоклеточному раку и метастазам (Knaup et al. 2011). Этот вывод был наблюдений, подтверждающих влияние TGF-β слелан на основе на ремоделирование ткани, усиление миграции и инвазию клеток через активацию металлопротеиназ. Увеличение инвазивности клеток сопутствует эпителиомезенхимному переходу, наблюдаемому у РДБЭ больных с тяжелыми клиническими проявлениями и при плоскоклеточной карциноме больных РДБЭ (Martins et al. 2009). Генетические модели РДБЭ (на мышах, в геном которых в ген *col7a* вводили мутации) демонстрировали повышенный уровень TGF-β в области рубцов и ран, а введение естественных ингибиторов пути TGF-β (декорин, лозартан) улучшало выживание мышей и снижало воспаление и фиброзы (Cianfarani et al. 2019).

Примером фиброзов при РДБЭ является псевдосиндактилия пальцев рук и ног у больных, возникающая в результате аберрантной регенерации. Основными медиаторами при развитии фиброзов при РДБЭ выступают факторы, многие из которых активируются TGF-β: белок внеклеточного матрикса тенасцин провоспалительные цитокины IL-1 и -6, секретирующиеся макрофагами, актин гладких мышц a-SMA, принимающий участие в стягивании краев раны (Boltzmann et al. 2015).

Хроническое воспаление на коже при РДБЭ, высокая активность цитокинов, факторов роста, миофибробластов с сократительной активностью под действием гладкомышечного актина (α-SMA) и постоянная стимуляция заживления ран является хорошей матрицей для возникновения онкообразований. Миофибробласты способны превращаться в раковые клетки и способствовать инвазии (Guerra et al. 2017; Condorelli et al. 2019; Fine et al. 2008).

Важно упомянуть и роль коллагена VII в ранозаживлении. Больные, с клетками которых была проведена эта работа, находятся именно на такой стадии и не имеют плоскоклеточных карцином. Этапы раневого процесса, в том числе и при РДБЭ, включают воспаление, образование грануляционной ткани, рубцевание. В результате воспаления активируются процессы регенерации, и дефект ткани постепенно заполняется грануляционной тканью, покрытой некротическими массами (*Рисунок 12*).



Рисунок 12. Грануляционная ткань: а — слабо выраженные грануляции; б — гнойные отложения на поверхности грануляций (4. Саркисов д. С. Грануляционная ткань // БМЭ. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1974-1988. — Т. 6., 1988. Т. 6).

В состав грануляционной ткани входят различные клеточные элементы, в том числе пролиферирующие фибробласты, макрофаги, лейкоциты, тучные клетки, и аморфное промежуточное вещество с сетью сосудов. При активации процесса регенерации морфология И синтетическая активность фибробластов грануляционной ткани сильно изменяются вследствие усиления процессов биосинтеза коллагена VII в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (Рисунок 12) (Хрущев Н., 1974). В процессе ранозаживления количество аморфного вещества снижается, увеличивается количество пролиферирующих фибробластов, в месте рубца активно откладываются и рассасываются пучки коллагеновых волокон (Рисунок 13; п. 2, Рисунок 6). Позже в составе рубцовой ткани помимо коллагена остаются немногочисленные сосуды и клетки, не способные синтезировать коллаген.



Рисунок 13. Фибробласт грануляционной ткани: 1 — ядро; 2 — коллагеновые волокна; 3 — рибосомы; 4 — эндоплазматический ретикулум; 5 — липид; 6 — митохондрии; 7 — аппарат Гольджи; х 30 000 (4. Саркисов д. с. Грануляционная ткань // БМЭ. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1974-1988. — Т. 6., 1988. Т. 6).

Развитие грануляций завершается в течение 3 недель в среднем, однако при различных нарушениях синтеза коллагена VII в фибробластах, в том числе при РДБЭ, воспаление может принимать хронические формы.

Дефицит коллагена VII приводит также к нарушениям мезенхимноэпителиальных взаимодействий при развитии зуба, вызывая нарушение дифференцировки амелобластов и синтеза амелогенина в раннем постанатальном развитии (Umemoto et al. 2012). Дефекты зубной эмали проявляются уже в раннем возрасте сразу после прорезывания зубов. Проблемой больных с РДБЭ является и то, что в дальнейшем состояние зубов, как правило, ухудшается из-за недостаточной гигиены полости рта из-за болезненности и ран на слизистой.

Для РДБЭ характерны и внекожные клинические проявления, при которых коллаген VII выполняет сигнальную функцию. Одним из сопутствующих нарушений при РДБЭ является врожденная иммунная дисфункция (Nyström et al. 2018). Исследования на моделях РДБЭ с мышами показали, что недостаток коллагена VII проявляется совместно с повышенной бактериальной колонизацией кожи независимо от пола и возраста больного. Это связано с потерей коллагена VII в ВКМ периферических лимфоидных органов, где в комплексе с кохлином, иммунным активатором лимфоидных органов, он участвует во врожденном поддержании иммунной системы. В мышиных моделях РДБЭ и у больных с РДБЭ дефицит коллагена VII вызывал нарушения иммунного ответа в ранах, а введение коллагена восстанавливало уровень кохлина в селезенке и активировало иммунный ответ в периферических лимфоидных органах, снижая уровень бактериальной колонизации в ранах.

Таким образом, коллаген VII выполняет структурную и сигнальную функции в составе белковых комплексов, играет важнейшую роль в различных аспектах биологии развития, и его недостаток приводит к широкому спектру нарушений, механизмы которых закладываются еще до рождения. Однако, удивительным является тот факт, что часто люди с дистрофической формой БЭ рождаются без сильной симптоматики, которая усиливается после нескольких лет жизни, что может быть связано с накопительным эффектом от продолжительного воздействия воспалительных сигнальных каскадов.

#### 11.Современные методы лечения РДБЭ

На данный момент лечение буллезного эпидермолиза дистрофического типа в основном симптоматическое и направлено на профилактику травм больного, облегчение течения болезни (обезболивание, физиотерапия, хирургические вмешательства, профилактика авитаминозов). Таким образом, исследования в терапевтических подходах представляют большой интерес. Современные методы лечения направлены на восстановление функция коллагена VII и включают заместительную генную, протеиновую, клеточную терапию,

культивирование и аллогенную трансплантацию фибробластов и кератиноцитов, костного мозга, МСК (мезенхимные стромальные клетки), плюрипотентные стволовые клетки, использование пуповинной крови и модельные исследования методов лечения на ИПСК (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки) (Wang, Lee, and Mcgrath 2014).

Методы генной терапии включают введение в фибробласты и кератиноциты полноразмерной кДНК *col7a1* с помощью транспозонных и лентивирусных конструкций, коррекцию мутаций генов путем транс-сплайсинга мРНК, введения разрывов в нуклеотидную последовательность ДНК с последующей репарацией (*Рисунок 14*).

Для генного редактирования *col7a1* используют различные технологии, такие как цинковые пальцы (ZFN), дизайнерские никазы (Kocher et al. 2019) и нуклеазы: CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) и более специфичная TALEN (activator-like effector nuclease). Нуклеазы позволяют вводить одно- и двунитевые разрывы в ДНК, впоследствии естественным образом репарирующиеся в клетках через негомологичную рекомбинацию (NHEJ) по матрице нормальной нуклеотидной последовательности или гомологичную репарацию (HDR). Редактирование нонсенс-мутаций *col7a1* с помощью нуклеаз в культивированных фибробластах больных РДБЭ показало восстановление экспрессии коллагена VII при трансплантации клеток мышиным моделям (March and Reichelt 2018; Hainzl et al. 2017). Ограничения данного метода состоят в низкой эффективности репарации и неспецифической активности нуклеаз.

Исправление мутации в экзоне путем РНК-подхода, **транс-сплайсинга**, позволяет заменять целые экзоны мРНК. Модуль транс-сплайсинга (участок кДНК, который должен заменить экзоны с мутацией) трансдуцируют в первичную культуру клеток, полученных от больного БЭ. Культивированные и трансплантированные мышиным моделям модифцированные клетки человека образовывали стабильный эпидермис с нормальной структурой, однако данный

метод представляется слишком трудоемким для клинического использования на человеке (Peking et al. 2019).



Рисунок 14. Функциональная терапия в клетках кожи больного. Восстановление функции гена при генной терапии может быть достигнуто путем (а) введения нормальной копии кДНК, (b) генного редактирования ДНК больного РДБЭ или (c) транс-сплайсинга мРНК, при котором возможна замена участка мРНК (Peking, Koller, and Murauer 2017).

Среди терапевтических подходов лечения РДБЭ наиболее успешным является аллогенная и аутотрансплантация генетически отредактированных кератиноцитов и фибробластов (*Рисунок 15*). Одним из безопасных методов заместительной генетической терапии дефицита коллагена VII является доставка полноразмерной кДНК *соl7а1* в фибробласты больного. Благодаря отсутствию генотоксичности для введения кДНК особенно эффективны самостоятельно инактивирующиеся лентивирусные конструкции (SIN). В
результате такой терапии у людей восстанавливается экспрессия коллагена VII, но не всегда восстанавливаются якорные фибриллы (Lwin et al. 2019). Мыши с моделью РДБЭ демонстрируют полное восстановление структуры кожи, экспрессии коллагена, а также якорных фибрилл в течение длительного времени (Titeux et al. 2010). Однако, при трансдукции часто происходят перестройки кДНК из-за большой длины и многочисленных повторов в последовательности кДНК. Альтернативным подходом является редактирование с помощью **транспозонов**, которые лучше подходят для интеграции в клетки больших последовательностей кДНК. Модифицированные таким методом кератиноциты человека с РДБЭ, пересаженные в кожу мыши с дефицитом коллагена VII показали восстановление экспрессии коллагена VII и его отложение в зоне БМ на уровне, сравнимом со здоровыми донорами, что позволяет считать этот метод потенциально применимым в медицине в будущем (Latella et al. 2017).



Рисунок 15. Аутотрансплантация генетически отредактированных фибробластов при лечении РДБЭ человека (Lwin et al. 2019).

Клеточная терапия включает аллогенную трансплантацию клеток в кожу больных РДБЭ с целью восстановления экспрессии нормального белка и структуры кожи. Известен успешный опыт лечения пограничной формы БЭ с мутацией в гене, кодирующем ламинин-332. Клетки больного были генетически редактированы с помощью методов генной терапии, культивированы и имплантированы в кожу больного. При этом в течение нескольких лет не было отмечено рецидивов БЭ (Hirsch et al. 2017). Для лечения РДБЭ изучают эффективность при аллогенной трансплантации костного мозга (Tamai and Uitto 2016), локализованного интрадермального введения аллогенных кератиноцитов и фибробластов, МСК из костного мозга, пуповины или плаценты (Petrova et al. 2020). Возможны модификации МСК для увеличения уровня экспрессии коллагена VII (Ganier et al. 2018). Все методы заместительной клеточной терапии показывали улучшение заживления ран за счет подавления воспалительных каскадов (Liao et al. 2018), увеличение экспрессии коллагена VII и, в некоторых случаях, восстановление якорных фибрилл. Однако не все методы приводили к долгосрочному положительному эффекту. Методы аллогенной траснплантации методы имеют свои ограничения из-за опасности, связанной с проведением химиотерапии для снижения иммунологического отторжения трансплантатов (Tamai and Uitto 2016).

Результаты, полученные при лечении кожи мышей с выключенным геном *col7a1* и кожи людей с РДБЭ могут отличаться из-за отличий строения кожи. Часто для моделирования заболеваний и тестирования лечения из кератиноцитов и фибробластов больных РДБЭ путем вирусной трансфекции получают иПСК, а также используют иммортализованные культуры клеток.

Другой потенциальный подход лечения РДБЭ – это **белковая терапия рекомбинантным коллагеном VII**. Белковая терапия предполагает прямое местное (интрадермальное) или системное (внутривенное) введение рекомбинантного коллагена VII и показывало временный эффект у мышиных моделей РДБЭ с образованием якорных фибрилл. Однако для эффективного лечения человека потребовалось бы очень большое количество инъекций (Woodley et al. 2013)

Еще один терапевтический подход направлен на усиление или подавление биохимических процессов и молекулярных каскадов, вызванных

38

отсутствием коллагена VII (Cianfarani et al. 2019; Liao et al. 2018; Odorisio et al. 2014; Atanasova et al. 2019).

Таким образом, последние данные из экспериментов на животных моделях и начальные клинические испытания дают надежду на разработку новых и эффективных методов лечения буллезного эпидермолиза дистрофического типа. Несмотря на то, что клинических методов лечения на данный момент нет, а для генно-инженерных разработок существуют риски неспецифичности редактирования, канцерогенности, возникновения непредвиденных эффектов, существующие методы уже значительно улучшают состояние модельных животных с дефицитом коллагена VII больных РДБЭ и восстанавливают функции кожи. Методы лечения РДБЭ могут быть полезными при лечении других типов БЭ и различных генетических заболеваний.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

# 1. Объект исследования

Объектом работы служили **образцы кожи** больных БЭ и первичные культуры дермальных фибробластов и эпидермальных кератиноцитов больных РДБЭ и здоровых доноров, а также мононуклеарная фракция периферической крови больных РДБЭ. Часть образцов кожи использовалась для иммуногистохимического анализа. Список доноров с диагнозом приведен в *Таблица* 3.

Таблица 3. Доноры кожи и клеток для исследований.

Донор	Клинический диагноз и описание мутации в col7a1
d1	РДБЭ, гомозиготная мутация в экзоне 3 ( $c.425A > G$ ) (Kocher et al.
	2019)
d2	РДБЭ, гетерозигота с мутациями в интроне 5 (с.682+1G>A)
	(Hashikawa et al. 2009) и экзоне 74 (c.6205C>T) (Kahofer et al.
	2003; Kakavand Hamidi et al. 2016)
da3	РДБЭ, гетерозигота с мутацией в экзоне 4 ( <i>c.520G&gt;A</i> ) и ранее не
	описанная мутация в экзоне 20 (с.2696-4_с.2696-delCCAG)
d4	РДБЭ
d5a	Неизвестный тип БЭ, предположительно, РДБЭ
d11	Неизвестный тип БЭ, предположительно, простой БЭ
d118	Здоровый донор
d138	Здоровый донор

# 2. Белковый вестерн-блот

Вестерн-блот был получен совместно со студентом лаборатории Евтушенко Н. А., под ее руководством. Доноры материала: d1, d2, da3, d118, d138. Мы

проводили вестерн-блот с целью анализа экспрессии коллагена VII, в качестве контрольного белка был выбран белок домашнего хозяйства бета-актин.

Протокол вестерн-блот анализа для b-актина:

- Электрофорез в ПААГ: Пробы в количестве 70 мкг (лизаты клеток) и маркер размера белков (Bio-Rad, США) наносились в лунки геля SDS-ПААГ 10%, толщиной 1,5 мм. (разделяющий гель: 10% акриламид (Fluka, Sigma-Aldrich, США), 375 мМ Трис-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% PSA (Sigma-Aldrich, США), 0.08% ТЕМЕД (Sigma-Aldrich, США); концентрирующий гель: акриламид 5%, 0.13М Трис-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% PSA, 1 мкл/мл ТЕМЕД).
- 2) Разделение с помощью вертикального электрофореза проходило в электродном буфере (25 мМ Трис, 192 мМ глицин (Sigma-Aldrich, США), 0.1% SDS) при напряжении 100 В.
- 3) Перенос на мембрану: перед окончанием электрофореза необходимо отрезать мембрану нужного размера, смочить 30 сек в этаноле для «активации», промыть дистиллированной водой и положить в буфер для переноса (150мМ глицин, 250 мМ Трис, 10% этанол). Для дальнейшего окрашивания белки переносили на мембрану поливинилиденфторида 0.45 мкм (PVDF) (Bio-Rad, CША). Перенос проводили методом полусухого переноса (15 B, 45 минут) в буфере с помощью прибора Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, CША) между целлюлозными листами. Для переноса положить целлюлозный лист, на него мембрану, на мембрану гель, сверху положить еще один лист и прокатать валиком, чтобы удалить лишний буфер. При переносе мембрана должна быть снизу, а гель сверху. Важно следить за тем, чтобы не было слишком много буфера, для этого прокатать конструкцию валиком. В течение всех операций мембрану можно приподнимать только пинцетом за край, где нет белка, так как она очень легко пачкается.
- 4) Мембрану промывали в ТВЅТ три раза по 10 минут.
- 5) *Окрашивание*: Перед окрашиванием мембрану с перенесенными белками инкубировали в блокирующем буфере следующего состава: раствор 5%

нежирного сухого молока (Bio-Rad, США) в Трис-солевом-буфере (20мМ Трис, 150мМ NaCl, pH 7.6) с добавлением 0.1% Tween-20 (TBST).

- 6) Мембрану промывали в ТВЅТ три раза по 10 минут.
- 7) В течение ночи мембрану инкубировали с раствором первичных антител к β-актин с разведением 1:1000 (поликлональные ab1801, Abcam, Великобритания) в блокирующем буфере при 4°C в «конверте» из парафилма.
- 8) Мембрану промывали в TBST три раза по 10 минут.
- 9) Инкубировали в течение часа при комнатной температуре в растворе вторичных антител против иммуноглобулинов кролика (#170-6515, Bio-Rad), конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенных в блокирующем буфере.
- 10) Мембрану промывали в ТВЅТ три раза по 10 минут.
- Визуализацию результата проводили с помощью набора для электрохемилюминесценции Clarity Western ECL Substrate ECL (Bio-Rad, CША). Съемку мембраны проводили с помощью ChemiDocMP Imaging System (Bio-Rad, CША) с использованием программного обеспечения Image Lab 5.0 (Bio-Rad, CША).

При проведении вестерн-блота с целью анализа экспрессии коллагена VII использовался протокол, аналогичный описанному, но с некоторыми модификациями:

- Для особенно больших белков, либо белков, плохо денатурирующих, существует вариант ПААГ с добавлением 6-8 М мочевины. Поэтому в растворы гелей для электрофореза добавляли мочевину до концентрации 8 М.
- 2) После проведения электрофореза гель инкубировали в растворах воды с восходящей концентрацией уксусной кислоты: 1% уксусной кислоты, 10% этанола 20 минут, 2% уксусной кислоты 5% этанола 15 минут, 2% уксусной кислоты по 15 минут в каждом растворе, далее в растворе 3% уксусной кислоты дважды по 15 минут.

- 3) Затем методом полусухого переноса (20 В, 120 минут) в 3% уксусной кислоте белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). При этом мембрана находилась над гелем. Перед переносом такую мембрану не надо «активировать», нужно сразу положить в буфер. Есть два типа мембран PVDF и NC (нитроцеллюлоза). На PVDF, как правило, перенос получается чище, но на NC мембрану белки переносятся легче, что используется для крупных (от 200кДа) белков.
- 4) Окрашивание антителами проводили аналогично описанному выше, антитела против COL7A (поликлональные, Invitrogen #PA5-18390) разводили в 3% блокирующем буфере 1:330. После промывки мембраны от первичных антител использовали готовый раствор вторичных антител против иммуноглобулинов козы в блокирующем буфере с лошадиной сывороткой ImmPRESS anti-Goat HRP (Vector, CША), инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре. Визуализация результата проводилась аналогично выше описанной.

Обсчет результатов проводили в программах ImageJ и Excel.

#### 3. Получение кДНК

Качество предварительно выделенной РНК из первичных культур клеток больных и здоровых доноров оценивали с помощью электрофореза на 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном электродном буфере ТАЕ (см. Электрофорез в агарозном геле).

Синтез первой цепи кДНК (кодирующая ДНК) с предварительно выделенной одноцепочечной РНК-матрицы проводили с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) согласно стандартному протоколу производителей. Матрицы РНК были получены студентом лаборатории Евтушенко Н. А. из фибробластов и кератиноцитов следующих доноров: d118, d1, d2, da3. Полученную кДНК использовали для амплификации различных экзонов *col7a1*.

# 4. ПЦР на матрице кДНК и геномной ДНК

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием полимераз OneTaq, LongAmp и ScreenMix (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CША) с дальнейшим анализом на электрофорезе в 2% агарозном геле. Для контроля контаминаций воды и праймеров параллельно с опытом проводили одну контрольную реакцию со смесью, содержавшую все компоненты смеси, но без добавления матрицы ДНК. Образцы ДНК были апмлифицированы со специфичными праймерами, комплементарными участкам, фланкирующим мутации в *col7a1 (Таблица 6)*. Для реакции общим объемом 25 мкл в пробирках для ПЦР объёмом 200 мкл смешивались следующие компоненты:

- 1 мкл 10 мМ прямого праймера;
- 1 мкл 10 мМ обратного праймера;
- X мкл n-кратной полимеразной смеси (в зависимости от концентрации используемой полимеразы);
- 1 мкл матрицы ДНК;
- 17 мкл воды;

Пробирки с готовой смесью для ПЦР помещали в амплификатор и запускали программу с температурным режимом (*Таблица* 4).

1 мин	95°C		
15 сек	95°С (денатурация)	34 цин	сла (при
20 сек	Т отжига праймеров*	необходимс	ости
1,5 мин	72°С (полимеризация)	количество	циклов
		увеличивал	и на 2-3)
3 мин	72°C		

Таблица 4. Программа амплификации для ПЦР с внешними праймерами.

\*Т отжига для праймеров рассчитывается индивидуально для каждой пары праймеров по формуле n(G+C)+m(A+T)+5 градусов Цельсия. Кроме того, *col7a1* имеет GC-богатую последовательность и для повышения эффективности ПЦР, как правило, используют высокие температуры отжига и большое время денатурации.

# Nested-ПЦР с заглубленных праймеров

После визуальной проверки на электрофорезе в агарозном 2% геле (см. Электрофорез в агарозном геле) все образцы разводились водой в 20 раз и использовались в качестве матрицы в объеме 1 мкл для внутреннего ПЦР (состав смеси аналогичен описанному выше, температурный режим приведен в *Таблица* 5). Мы использовали **«внутренний» ПЦР (Nested-ПЦР)** для повышения специфичности и чувствительности амплификации. «Внутренний» ПЦР включает в себя использование второго набора праймеров для отжига с короткими последовательностями, находящимися внутри ампликона с первой пары праймеров.

Таблица 5. Программа амплификации для ПЦР с внутренними праймерами.

15 сек	95°C	14 циклов (при
20 сек	58°С и выше*	необходимости также
		увеличивали на 2-3)
2,5 сек	72°C	

\*58°С допустимо для первого цикла, далее Т отжига желательно увеличить по причинам, описанным выше.

Таблица 6. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров на col7a1.

Последовательность	Название праймера
AGGGGGGCAACACTCGCACA	ex3 fw
ACAGGGGCTGCAATTCTCCA	4-20 fw (на 3 экзон)
GCTGACCATGTCTTCCTGCCC	4-20 nested fw (на 3 экзон)
CTATTTGCTGTGG_GGATCAAGA	ex5-4col7a1rev (на стык экзонов)
AGGGTCCGTAAAGTGGGCAG	4-20 rev (на 20 интрон)
GGGTCTGCGGGATCCGTGACA	4-20 nested rev (на 20 интрон)
CTATTTGCTGTGG GGATCAAGA	ex5-4col7a1rev

Последовательность	Название праймера
GCTGGGACAGCCACT	ex6 nested rev
TGTGACTGGCTACAAGGTCCAGT	ex6reverse

## 5. Электрофорез в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК по длине проводили в трисацетатном электродном буфере ТАЕ (40 мМ трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА) в 2% агарозном геле.

- В плашку для электрофореза устанавливали гребенку и заливали расплавленный 2% агарозный гель, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл. Гель был приготовлен на трис-ацетатном электродном буфере ТАЕ (40 мМ трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА).
- 2) После застывания геля убирали гребенку, помещали плашку в горизонтальную камеру для электрофореза, заполненную буфером ТАЕ.
- 3) Наносили в лунки в геле образцы в объеме 2-3 мкл в зависимости от концентрации ДНК в образце. Для сравнения размеров образцов ДНК в одну из лунок добавляли 2 мкл маркера длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия).
- 4) Электрофорез проводили 30 мин при 115 В (источник питания PowerPac HC, Bio-Rad, CША).
- 5) Визуальный анализ геля проводили с помощью системы ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, CША) и компьютерной программы Image lab software (Bio-rad, США). Для лучшей визуализации изображения меняли настройки выдержки в зависимости от количества ДНК в полосах.

# 6. Клонирование ПЦР-продуктов (лигирование)

Фрагменты ДНК после амплификации были клонированы в линейный pAL2-T вектор (Евроген, Россия) и использованием набора для клонирования Quick-TA kit (Евроген, Россия). Вектор pAL2-T несет ген устойчивости к

ампициллину и подходит для сине-белой селекции клонов. Для реакции лигирования готовили смесь реактивов объемом 10 мкл:

- 1 мкл (50 нг) линейного плазмидного вектора pAL2-T;
- 1 мкл (200 ед.) Т4 ДНК-лигазы;
- 1 мкл 10х буфера для лигирования overnight;
- 1 мкл ДНК-вставки (продукт ПЦР).

Смесь инкубировали ночь (14-16 часов) при +14°С.

## 7. Химическая трансформация компетентных клеток Е. coli

Полученный лигат трансформировали в клетки Е. coli штамм XL1-Blue (Евроген, Россия), предназначенные для последующей сине-белой селекции.

- 1) Пробирку с компетентными клетками штамма XL1-Blue, хранящиеся при -70°С, доставали, помещали в лоток со льдом.
- К 100 мкл суспензии клеток добавляли 5 мкл плазмидной ДНК (лигата) и инкубировали на льду в течение 25 мин. для размораживания клеток.
- 3) Пробирку со смесью инкубировали 1,5 мин при 42°С (хит-шок).
- 4) Снова помещали в лед на 1 мин.
- 5) В пробирку добавляли 300 мкл среды LB (10 г/л бакто-триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, вода дист., доведение NaOH до pH 7.0), переносили на качалку и инкубировали 40 мин при 37°C.
- Подготовили чашки Петри с LB-агаром, содержащие Amp (50 мкг/мл). Для этого на 100 мл LB добавляли 2 г бактериального агара и 200 мкл 1000х Amp.
- 7) Для селекции колоний с помощью сине-белого теста распределили 40 мкл стокового раствора X-Gal (20 мг/мл) и 40 мкл стокового раствора индуктора промотора ИПТГ (100 мМ) на поверхность агара.
- Трансформированные клетки высевались шпателем Дрыгальского на чашки и культивировались при 37°С ночь.
- 9) Отбирались колонии белого цвета.

ИПТГ является стабильным синтетическим аналогом лактозы, инактивирует lac-peпрессор и индуцирует синтез бета-галактозидазы. X-Gal расщепляется бета-галактозидазой с образованием осадка синего цвета. Используемый штамм Е. coli содержит прерванный ген бета-галактозидазы, таким образом, после культивирования колонии, не содержащие вставку станут синими.

#### 8. ПЦР-скрининг

Отбор рекомбинантных клонов осуществлялся с помощью ПЦР-скрининга колоний e.Coli со стандартной парой праймеров М13 (Евроген, Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров:

M13 Forward: 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGTG-3'

M13 Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'.

- 1) Готовилась смесь реактивов:
  - 1 мкл прямого и обратного праймеров M13;
  - 2 мкл 5х смеси ScreenMix (Евроген, Россия);
  - 6 мкл воды.
- 2) С помощью зубочистки в пробирки со смесью вносили бактерии с чашек, при этом каждая бактериальная колония, взятая для ПЦРскрининга, была высеяна штрихом этой же зубочистки на новые чашки. Таким образом, мы сразу получали колонии для последующих опытов.
- 3) Смесь инкубировали 1 минуту на 95°С, затем запускали реакцию из 21 цикла: денатурация ДНК 15 с на 95°С, отжиг праймеров 15 с на 60°С, синтез ДНК 1 мин с на 72°С.
- Результаты скрининга клонов проверяли на электрофорезе в 1% агарозном геле.

## 9. Ночная культура клеток

С чашек, колонии на которых показали положительный результат при ПЦР-скрининге, была поставлена ночная культура для наращивания массы клеток.

- В пробирку для культивирования объемом 50 мл добавляли 3 мл среды LB, содержащую 3 мкл ампициллина (до концентрации 100 мкг/мл).
- С помощью зубочистки колонию е. Соli вносили в пробирку для культивирования. Пробирку неплотно закрывали крышкой и заматывали фольгой. Культивировали в течение ночи на качалке при 37°С.

## 10.Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК из культуры клеток Е. coli использовали стандартный протокол и готовый набор Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) с микроцентрифужными колонками.

Выделение вторым, «ручным» методом без колонок для последующего секвенирования:

- Биомассу ночной культуры центрифугировали дважды по 15 минут на приборе Centrifuge 5804 (Eppendorf, Германия) при 14000 об/мин, после каждого раза удаляя верхнюю фазу пипеткой.
- 2) Помещали осадок из фалькона в пробирку объемом 2 мл и добавляли последовательно растворы: 250 мкл ресуспендирующего раствора, 400 мкл лизирующего раствора, содержащего NaOH И SDS, 300 МКЛ нейтрализующего раствора. После добавления реактива каждого перемешивали содержимое переворачиванием пробирки.
- 3) Затем пробирку помещали на -20°С на 10 мин.
- 4) Центрифугировали в течение 10 мин на 14000 об/мин.
- Переместили супернатант в отдельную пробирку, добавили к нему 670 мкл изопропанола и центрифугировали 3-5 мин до осаждения ДНК, супернатант удалили, осадок высушили.

- 6) Добавили 300 мкл 80% EtOH, центрифугировали 5 мин, удалили супернатант и полностью осушили осадок.
- 7) Выделенные плазмиды растворяли в 30-50 мкл воды.

#### 11.Спектрофотометрия

Измерение концентрации ДНК (в объеме 1 мкл) проводилось на спектрофотометре Nanophotometer P-330 (Implen, Германия).

#### 12.Секвенирование по Сэнгеру

Образцы ДНК, полученные с ПЦР, были секвенированы по Сэнгеру с праймерами М13, фланкирующими область вставки, в компании Евроген. Анализ результатов секвенирования проводили с помощью программ SnapGene, Splice Site Prediction by Neural Network (BDGP), ресурсов BLAST и BLASTX.

#### 13.Криотомия

Образцы кожи пациентов были заморожены в заливочной среде Tissue-Tek OCT compound (Sakura, Япония) при температуре -70С. Образцы были нарезаны на криотоме Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия), толщина срезов составила 5 нм. Срезы располагались тремя группами по 3-4 среза на предметных стеклах с адгезионным покрытием Superfrost plus (Thermo Scientific, Германия), качество срезов проверяли на световом микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

#### 14.Иммуногистохимическое окрашивание.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Krt 5, Krt 14, Plectin. Изготовление и окрашивание срезов были сделаны совместно со студентом лаборатории Толстолужинской Анастасией. Были использованы срезы кожи от пациентов больных БЭ (d5a, d11) и здорового донора (норма). Окрашивание проводили по следующему протоколу:

- 1) Срезы отмывали от криопротектора в PBS 3 раза по 5 мин;
- 2) Для фиксации срезы инкубировали в 10% формалине 10 мин;
- 3) Промывали в PBS 3 раза по 5 мин;
- 4) На каждую группу срезов на предметном стекле наносили раствор с одним первичным антителом. Срезы инкубировали с первичными моноклональными рекомбинантными антителами кролика на плектин [#E398P], цитокератин 14 [#EPR17350] и цитокератин 5 [#EP1601Y] (Abcam, Великобритания) в блокирующем буфере на основе PBS (PBS: 1.7mM KH2PO4, 5.2mM Na2HPO4, 150mM NaCl) во влажной камере в течение ночи при +4C. Антитела к цитокератину 5 были конъюгированы с меткой Alexa Fluor 488. Состав блокирующего буфера: PBS, 0,3% Triton X-100, 10% стерильно отобранной сыворотки FBS (фетальная бычья сыворотка, HyClone, США). Антитела разведены в блокирующем растворе в соотношениях: 1:150 Krt 5, 1:500 Krt 14, 1:250 Plectin.
- 5) Промывали PBS 3 раза по 10 мин;
- 6) Области, анализируемые на Krt 14 и Plectin, инкубировали со вторичными поликлональными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, конъюгированными с Alexa Fluor 488 [#R37118] (Invitrogen, США) в разведении 1:500 в блокирующем буфере на PBS в темном месте 2 часа;
- 7) Промывали PBS 3 раза по 5 мин;
- Контрастная окраска ядер: инкубировали в Dapi [#10236276001] (Biotum, США), разведенном в концентрации 2,5 мг/мл в PBS 15 мин;
- 9) Промывали PBS 3 раза по 5 мин;
- 10) Срезы заключали под покровное стекло в 50% глицерин.

Также коллегами (Рожихин Никита, лаборатория Карамовой А.Э.) из Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии Минздрава РФ (cnikvi.ru), возглавляемом Кубановым А. А., были получены и окрашены первичными антителами к коллагену VII срезы кожи больного da3 и здорового донора. Фотографии срезов представлены в данной работе с разрешения авторов в рамках совместной работы по изучению БЭ.

## 15.Конфокальная микроскопия и обработка изображений.

Анализ срезов, окрашенных на белки дермо-эпидермального соединения, проводили на Конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Использовалась эмиссия 488 нм для выявления окраски белков Krt 5, Krt 14, Plectin и 460 нм для выявления окраски DAPI. Обработка изображений в программах Photoshop и Fiji сделана студентом лаборатории Толстолужинской Анастасией.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большой col7a1. размер гена наличие повторяющихся последовательностей, GC-богатое содержание являются факторами, которые создают сложности при транскрипции и в пост-транскрипционных процессах. Коллаген VII имеет многоуровневую сложную структуру, и его функция, напрямую зависящая от пространственной укладки, может пострадать от мутаций. При этом может нарушиться не только фолдинг белка, но и способность к секреции проколлагена из ЭПР на поверхность клетки. Мутации в такой сложной организации гене ΜΟΓΥΤ приводить К доминантным фенотипическим проявлениям – белок становится токсичным для клетки. В случае мутаций, исследуемых в данной работе, можно говорить о рецессивном их характере наследования. В частности, первая мутация (см. стр. 23, главу Мутации в гене *col7a1*, кодирующем коллаген VII) высокочастотная среди популяции RDEB Западной Европы. Исходно эта мутация была описана как консервативная замена (т.е. замена на аминокислоту с аналогичными биохимическими свойствами, аминокислоту того же класса) аргинина на лизин в последовательности аминокислот (Рисунок 25, Рисунок 27). Такие замены неконсервативные, остаются незамеченными для чаще, чем защитных механизмов клетки. Консервативные замены практически не влияют на структуру белка, если трансляция идет со зрелой мРНК. Но впоследствии оказалось, что в результате такая замена затрагивает донорный сайт сплайсинга в положении «-2». Когда нарушается процесс сплайсинга пре-мРНК, то это всегда приводит к тяжелым патологиям. Понимание этих процессов важно для РДБЭ, выявления механизмов исследования патогенеза и пониманию возможных путей коррекции врожденного нарушения.

# 1. Результаты ПЦР с кДНК больных с РДБЭ d1, d2 и здорового донора d118.

С помощью ПЦР с полученных кДНК больных РДБЭ d1, d2 были амплифицированы специфические фрагменты последовательности ДНК.

53

Праймеры на *col7a1* были подобраны нами таким образом, чтобы они были комплементарны участкам, фланкирующим мутацию d1 в 3 экзоне (*Pucyнok* 16).

Рисунок 16. Фрагмент нормальной нуклеотидной последовательности гена col7a1 с отмеченными праймерами (зеленый). Выбранные праймеры фланкируют участок с мутацией c.425A>G больного d1 в 3 экзоне (отмечен красным нуклеотид A, мутировавший вследствие транзиции на G).

На агарозном электрофорезе мы предполагали увидеть различие в длинах фрагментов после ПЦР амплификации у больного и здорового донора, что продемонстрировало бы наличие нарушений в сплайсинге пре-мРНК при мутациях. На фотографии геля видно, что полоса на дорожке 1 (d1) имеет большую длину, чем на дорожке 2 (здоровый донор d118). Таким образом, вероятно, происходит нарушение сплайсинга и удержание интрона в результате мутации в 3 экзоне *col7a1* у больного d1, что приводит к большей длине фрагмента ДНК, чем у нормы.



Рисунок 17. Электрофорез продуктов ПЦР в 2% агарозном геле. Размер продуктов ПЦР совпадает с ожидаемым, амплификация происходит специфично.

Так как в качестве матрицы была использована кДНК, которая не содержит интронов, и мутация в d2 (дорожка 3) не включена в полученный фрагмент, выбранные праймеры не подходят для амплификации участка мутации больного d2, так замена нуклеотида находится в 5 интроне. Однако, для d2 (дорожка 3) результат тоже можно объяснить: очевидно, что мутация сайта сплайсинга d2 в любом случае влияет на длину кДНК даже при амплификации участка до сайта мутации, так как длина фрагмента амплификации не совпадает с нормой (*Рисунок 17*). Также для d2 видна гетерозиготность по мутации, так как видно несколько полос разной длины, одна из них имеет длину, соответствующую здоровому контролю (d118). Результаты совпадают с нашими ожиданиями и согласуются известными Нам с ИЗ литературы данными. удалось продемонстрировать наличие мутаций сайтов сплайсинга в районе 4 и 5 экзонов *col7a1* y d1 и d2.

#### 2. Анализ результатов секвенирования

Для точного подтверждения специфических мутаций мы провели секвенирование кДНК для d1 и геномной ДНК для da3.

## 2.1 Результаты секвенирования для больного da3

**4-х нуклеотидная делеция на стыке 20 экзона с 19 интроном** должна была быть подтверждена данными прямого секвенирования по Сэнгеру. Для получения фрагмента были подобраны праймеры и их сочетания так, чтобы они не давали побочных продуктов в ПЦР амплификации.

После проведения ПЦР амплификации фрагмент клонировали в вектор рАLТ для секвенирования. Результаты секвенирования 5 разных плазмид сравнивали между собой с помощью пакета программ SnapGene.

С помощью выравнивания в программе BLAST мы показали, что полученная отсеквенированная последовательность соответствует гену *col7a1* человека и имеет четырехнуклеотидную делецию (*Рисунок 18, Рисунок 19*).



# Рисунок 18. Мутация со17а1 на стыке 20 экзона с 19 интроном у да3.

С помощью программы SnapGene продемонстрирована делеция четырех нуклеотидов в гене *col7a1* больного da3, что совпадает с имеющимися данными высокопроизводительного секвенирования на Illumina NGS (next generation 19). При sequencing), полученными ранее (Рисунок сравнении последовательности da3 с референсной после однозначно читаемого фрагмента наблюдается наложение пиков, это свидетельствует о том, что образец содержит примесь второй аллели без делеции. Таким образом, мы подтверждаем еще и гетерозиготность по данному заболеванию. На стыке 20 экзона с 19 интроном четко определяются невысокие пики 4 нуклеотидов GCTG (обратное прочтение) нормальной аллели, наложенные на высокие пики нуклеотидов GAGA аллели с делецией (обратное прочтение). Таким образом, произошел сдвиг анализируемой последовательности в результате делеции. Анализ сплайсинга участка гена с данной мутацией позволяет предположить, что пропадает акцепторный сплайсинга, вследствие чего не работает и донорный сайт. Это

должно приводить к удержанию интрона между 19 и 20 экзоном, что изменяет последовательность зрелой мРНК. В результате в интроне обнаруживается преждевременный стоп-кодон TGA (*Рисунок 20*), что влияет на процессы трансляции и приводит к деградации дефектной мРНК по механизму запрограммированной клеткой нонсенс-опосредованной деградации NMD (<u>nonsense-mediated mRNA decay</u>). Механизм этого процесса показан ниже (*Рисунок 30*).



Рисунок 19. Хроматограмма с делецией для 20 экзона col7a1 da3 (обратное прочтение ДНК). Красным отмечена позиция, в которой выявлены отличия.

Рисунок 20. Стоп-кодон TGA, возникающий в рамке считывания при удержании интрона в результате мутации с.2696-4\_с.2696-delCCAG в 20 экзоне col7a1 da3. Светлым цветом выделены 19 и 20 экзоны, ярко-красным цветом выделен стоп-кодон. Голубым цветом и подчеркиванием обозначено место делеции.

## 2.2 Мутация в 4 экзоне *col7a1* da3

Мутация в 4 экзоне *col7a1* da3 описана ранее как замена G на A (c.520G>A) в гетерозиготном состоянии. Мы провели секвенирование области четвертого экзона *col7a1* da3 для подтверждения мутации. Выравнивание полученной последовательности с последовательностью нормального *col7a1* человека в BLAST обнаружило замену нуклеотида G на A в 4 экзоне, что соответствует данным NGS этого больного (*Рисунок 21*).

Query	1	CTGGTGGACACAGCTGCCCAAAGGCTGAAGGGGCAGGGGGTCAAGCTATTTGCTGTG <mark>A</mark> GT	60
Sbjct	6840	CTGGTGGACACAGCTGCCCAAAGGCTGAAGGGGCAGGGGGTCAAGCTATTTGCTGTG <mark>G</mark> GT	6899

Рисунок 21. Выравнивание анализируемой последовательности da3 с последовательностью col7a1 человека в BLAST: подтверждена мутация, замена A на G в положении 520.

Так как в задачи нашей работы входил анализ механизмов нарушений синтеза белка, для изучения нарушений сплайсинга пре-мРНК *col7a1* мы оценивали вероятность образования новых донорных и акцепторных сайтов сплайсинга для da3 в программе Splice Site Prediction by Neural Network (*Pucyнok 22, Pucyнok 23*). Несмотря на то, что нуклеотидная замена не затрагивает непосредственно сайт сплайсинга, возможно, что соседние нуклеотиды влияют на выбор сайта. Таким образом, мы предположили, что сплайсинг может происходить по альтернативным сайтам, появившимся в результате мутации. Анализ подтвердил гипотезу, что мутация на самом деле приводит к нарушению сайта сплайсинга, при этом образуется <u>новый донорный сайт</u> upstream.

Donor site predictions:

Score	Exon	Intron
0.57	atttgct	tgtgagtaa

Acceptor site predictions:

Score	Intron	Exon	
0.52	cctgatgggtcgtca	cttcagggatcaagaatgctgaccc	t

Рисунок 22. Вероятность образования новых донорных и акцепторных сайтов сплайсинга пре-мРНК при мутации в 4 экзоне da3. Сплайсинг будет происходить по новому донорному сайту, акцепторный сайт соответствует норме.



Рисунок 23. Показаны 4 и 5 экзоны нормального гена col7a1. Нормальные сайты сплайсинга 4 и 5 экзонов отмечены на последовательности геномной ДНК красным. Новый донорный сайт может образоваться в экзоне 4 col7a1 da3 (отмечен зеленым) так, что сплайсинг начнется раньше, чем в нормальной последовательности коллагена. Место нуклеотидной замены (c.520G>A) отмечено желтым.

Также мы проанализировали влияние мутации на процессы трансляции. С BLASTX помощью программы было показано, что при трансляции анализируемой последовательности миссенс-мутация c.520G>A приводит к замене глицина на аргинин p.Gly174Arg (p.G174R) в последовательности белка, что соответствует описанию мутации в литературе. За счет образования нового донорного сайта сплайсинг начнется раньше, нормальной чем В последовательности. В результате неправильного сплайсинга в рамке считывания возникает преждевременный стоп-кодон (ПСК) TGA (*Pucyhok 24*),

что является сигналом к активации механизма нонсенс-опосредованной деградации мРНК (NMD, nonsense-mediated mRNA decay), трансляция преждевременно прекращается, не позволяя синтезировать нормальный коллаген VII (*Рисунок 30*). На проявление болезни и уровень белка в коже da3 влияет также мутация во второй аллели в 20 экзоне *col7a1*. Взятые вместе, эти нарушения приводят к отсутствию функциональных якорных фибрилл и, соответственно, заболеванию РДБЭ. Мутации сайтов сплайсинга такого типа всегда являются патологическими.

AAGGTCTGCATCCTGATCACAGACGGGAAGTCCCAGGACCTGGTGGACACAGCTGCCCAAAGGCTGA AGGGGCAGGGG GTC AAG CTA TTT GCT gga tca aga atg ctg acc ctg agg agc TGA agc gag ttgcctcacagcccaccagtgacttcttcttcttcgtcaatgacttcagcatcttgagga

Рисунок 24 Последовательность 4 и 5 экзонов col7a1 da3 после сплайсинга по новому донорному сайту upstream с разбиением на кодирующие кодоны. Голубым обозначен 4 экзон, начиная с нового донорного сайта, серым выделен 5 экзон. Зеленым шрифтом показан возникающий в результате мутации da3 стоп-кодон TGA в открытой рамке считывания.

#### 2.3 Результаты секвенирования для больного d1

Мутация в 3 экзоне *col7a1* d1 известна как c.425A>G. Мы получили результаты секвенирования области 3 экзона кДНК *col7a1* d1 с мутацией c.425A>G. На основе наших результатов с ПЦР, мы ожидали, что мутация будет приводить к удержанию интрона (*см. выше, Рисунок 17*). Выравнивание полученной последовательности с последовательностью *col7a1* человека обнаружило замену нуклеотида A на G (позиция c.425A>G), в результате которой аргинин меняется на лизин, что подтвердило данные NGS этого больного (*Рисунок 25*).

Рисунок 25. Выравнивание анализируемой последовательности col7a1 d1 с последовательностью col7a1 человека в BLAST. Красным и желтым обозначена мутация больного d1 (в 3 экзоне AGG вместо AAG), приводящая к замене аргинина на лизин.

Однако, как показали результаты секвенирования, при данной мутации нарушен нормальный сплайсинг между 3 и 4 экзонами, что, как и ожидалось, приводит к удержанию интрона между ними (*Рисунок 26*). Как и предсказывалось *in silico* из-за замены нуклеотида донорный сайт сплайсинга для этого интрона теряет свои функции.

3 экзон	GCTGACCATGTCTTCCTGCCCCAGCTGGCCCGACCTGGTGTCCCCA <mark>G</mark> GTGATCCCTACCCTACCATGC
интрон	CTCGCAAGATGACCCCAAATGAAGTGTCCAGGGGAACCGTGATTTGACCCCTGCACCTGTCCCAGGTCT
	GCATCCTGATCACAGACGGGAAGTCCCAGGACCTGGTGGACACAGCTGCCCAAAGGCTGAAGGGGCAG
4 экзон	GGGGTCAAGCTGTTTGCTGTGGGGATCAAGAATGCTGACCCTGAGGAGCTGAAGCGAGTTGCCTCACAG
	CCCACCAGTGACTTCTTCTTCGTCAATGACTTCAGCATCTTGAGGACACTACTGCCCCTCGTTTCCCG
5 экзон	GAGAGTGTGCACGACTGCTGGTGGCGTGCCT

Рисунок 26. Фрагмент результата секвенирования кДНК col7a1 d1 с мутацией c.425A>G (с прямого праймера). Удержание интрона при сплайсинге между 3 и 4 экзонами. Сплайсинг между 4 и 5 экзонами происходит без изменений. Желтым выделена замена нуклеотида, серым выделены экзоны 3 и 4 с интроном между ними (красная стрелка), зеленым – экзон 5.

При трансляции пептида с мРНК <u>удержание интрона</u> ведет к образованию дополнительных аминокислот в последовательности коллагена VII (*Рисунок 27*), что, очевидно, влияет впоследствии на структуру белка вызывает изменение его структуры и нормальных функций. Таким образом, как и в случае с da3, миссенсмутация, приводящая к консервативной замене **аргинина на лизин**, на самом деле приводит к нарушению сайта сплайсинга и является патологической.

Query	86	IADHVFLPQLARPGVP <mark>R</mark>	VIptptmppkmtpNEVSRGTVI*PLHLSQVCILITDGKSQDLV	265
		+ADHVFLPQLARPGVP <mark>+</mark>	V CILITDGKSQDLV	
Sbjct	126	VADHVFLPQLARPGVP <mark>K</mark>	VCILITDGKSQDLV	156

Рисунок 27. Выравнивание аминокислотной последовательности для d1 с коллагеном VII типа человека в BLASTX. Желтым выделена замена аргинина на лизин.

# 3. Анализ сплайсинга для больного d2

Нам не удалось получить результаты секвенирования для больного РДБЭ d2, однако, в работе мы приводим анализ сплайсинга на основе описания данной мутации в ранних статьях и подтверждаем наличие мутации с помощью результатов ПЦР. Мутация в 5 интроне *col7a1* d2 описана как замена нуклеотида G на A в положении c.682+1G>A (*Pucyнok* 28). На основе результатов ПЦР, где были показаны наличие мутации и гетерозиготность по мутации у d2 (см. выше, *Pucyнok* 17), мы предположили, что такая мутация будет влиять на сплайсинг пре-мРНК. Анализ сайтов сплайсинга с помощью программы Splice Site Prediction by Neural Network показал <u>отсутствие донорного сайта сплайсинга</u> в результате данной мутации. При этом в *col7a1* дикого типа (исходная последовательность) программа четко распознавала донорный сайт сплайсинга с вероятностью 0,90 (*Pucyнok* 29).

Правильная последовательность *col7a1* для фрагмента 5 экзона (выделен цветом): састаствеессетсетттеесеваеаеваетегеесеваеествеесеваеессеваеесваеесеваеесеваеесеваеесеваеесеваеесеваеесваеесваееваевваеесеваеевваеввае

Рисунок 28. Мутация сайта сплайсинга в 5 интроне col7a1 d2: выделена замена нуклеотида G на A (c.682+1G>A). Стрелкой показан преждевременный стоп-кодон TAG. Donor site predictions:

Start	End	Score	Exon	Intron
180	194	0.90	cgacctc	gtgagttc
Accept	tor site	prediction	s:	
Start	End	Score	Intron	Exon
4	44	0.52	cctgatg	ggtcgtcacttcaQggatcaagaatgctgaccct

Рисунок 29. Анализ сайтов сплайсинга с помощью программы Splice Site Prediction by Neural Network для исходной последовательности col7a1 дикого типа. Программа четко распознавала донорный сайт сплайсинга с вероятностью 0,90 в col7a1 без мутации, однако, в результате мутации d2 в 5 интроне он перестает правильно работать.

Таким образом, данный сайт не работает при сплайсинге, в результате мутации происходит удержание интрона, в котором при считывании в открытой рамке обнаруживается преждевременный стоп-кодон трансляции TAG (*Рисунок* 28, показан стрелкой). Также (далее к 3'концу) в 5 интроне встречается еще один стоп-кодон – TGA (не показано). Подобные ПСК приводят к деградации мРНК после первого раунда трансляции по механизму NMD (*Рисунок 30*), соответственно, транскрипция с этого аллеля и последующая трансляция не будет приводить к появлению функционального белка (Rehwinkel, Raes, and Izaurralde 2006; Lykke-Andersen, Shu, and Steitz 2000). Вероятно, запрограмированная клеткой деградация аберрантной мРНК с помощью механизма NMD существенно облегчает симптомы РДБЭ благодаря тому, что снижает синтез потенциально токсичного аберрантного белка. Таким образом, поскольку данная мутация гетерозиготная, трансляция будет приводить к синтезу белка лишь при работе второй аллели d2. Однако, вторая аллель, согласно данным NGS секвенирования, несет миссенс-мутацию далее, в 74 экзоне, также гетерозиготную и рецессивную (с.6205С>Т, р.R2069С, см Таблица 2, Таблица 3). Данная мутация не приводит к нарушению стабильности мРНК, но вызывает изменения в пространственной укладке белка COL7A1. Данный тип наследования имеет характер сложной гетерозиготы, при котором каждая мутация по отдельности имеет рецессивный тип наследования, но при

совместном их присутствии в клетке они имеют выраженное фенотипическое проявления РДБЭ. В данном случае больной d2 имеет проявления, характерные для RDEB тяжелой генерализованной формы (RDEB severe generalized). Таким образом, что так же, как и в случае больных РДБЭ d1 и da3, мутации, обнаруженные у d2, будут приводить к нарушениям функций кожи за счет отсутствия функционального COL7A1.



Рисунок 30. Нонсенс-опосредованный распад мРНК NMD (nonsensemediated mRNA decay) (Альбертс et al. 2013). Эукариотические клетки имеют посттранскрипционные механизмы, обеспечивающие точность экспрессии генов. Только мРНК с полным потенциалом кодирования доступны для трансляции в цитоплазме (слева). Не прошедише нормальный сплайсинг мРНК подвергаются деградации в цитоплазме по механизму нонсенс-опосредованного распада мРНК NMD (nonsense-mediated mRNA decay), что предотвращает синтез белков с дефектной матрицы (справа). Этот защитный механизм активно участвует в эмбриональном развитии, дифференцировке клеток, клеточном стрессе и канцерогенезе. Аберрантные мРНК часто содержат преждевременный стоп-кодон (ПСК), возникающий при ошибках в процессинге - UAA, UAG или UGA. В ядре при сплайсинге границы экзоном маркируются белковым комплексом EJC (exon junction complex), ключевым компонентом активации NMD распада мРНК. При выходе зрелой мРНК в цитоплазму в первом

«пробном» раунде трансляции рибосома, считывая последовательность мРНК, удаляет все комплексы ЕЈС. Однако, при наличии ПСК часть ЕЈС остаются на мРНК и служат сигналом к деградации аберрантной мРНК. ЕЈС узнаются с помощью комплекса белков Upf, они позволяют признать стоп-кодон преждевременным (ПСК) и активировать распад NMD. Таким образом, NMD устраняет дефектные мРНК после первого раунда трансляции, и потенциально вредные усеченные белки не синтезируются в большом количестве (Rehwinkel, Raes, and Izaurralde 2006; Lykke-Andersen, Shu, and Steitz 2000).

Нами было показано, что в некоторых случаях врожденный РДБЭ ассоциирован с мутациями, в результате которых образуется ПСК. Одним из потенциальных методов лечения как БЭ, так и других врожденных заболеваний, вызванных появлением ПСК с последующим распадом мРНК, являются подходы к регуляции активности и ингибирования NMD. Интересным является тот факт, что процесс NMD сильно заингибирован в эмбриональном развитии. Может ли это быть причиной того, что RDEB не детектируется пренатально? Этот и другие вопросы регуляции экспрессии коллагена VII в процессе развития еще предстоит выяснить. На данный момент известен целый спектр химических веществ, использующихся в клинических испытаниях для ингибирования NMD и восстановления белка. Эффективными экспрессии полноразмерного ингибиторами NMD являются аминогликозиды, которые нарушают распознавание рибосомой стоп-кодонов. Клинические исследования в лечении мышечной дистрофии Дюшена (Wagner et al. 2001) с помощью гентамицина показали, что аминогликозиды потенциально могут быть использованы в лечении других врожденных заболеваний, и, в нашем случае, при РДБЭ.

4. Анализ распределения и интенсивности экспрессии структурных белков кожи (проводился совместно со студентом лаборатории Толстолужинской Анастасией).

Мы использовали иммуногистохимическое окрашивание клеток антителами против маркерных структурных белков дермо-эпидермального соединения для

визуальной качественной оценки паттерна экспрессии белков и предварительной диагностики типа БЭ. Клинические проявления БЭ у доноров d11 и d5a соответствовали РДБЭ и простому БЭ, однако точный диагноз не был поставлен ранее. Как видно из фотографий окрашенных срезов кожи:

- 1) Для кератина 5 не отмечалась разница в паттерне экспрессии в коже у d5a и d11 по сравнению со здоровым контролем (*Рисунок 32*).
- 2) Кератин 14 демонстрирует неравномерную экспрессию и образование агрегатов в краевой цитоплазме клеток у d11 по сравнению со здоровым контролем (*Рисунок 31, Рисунок 32*), что может свидетельствовать о нарушенной структуре синтезированного белка. У d5a визуально агрегатов не наблюдается.
- 3) Окрашивание кожи антителами против плектина показало измененный паттерн экспрессии плектина у двух больных БЭ (результаты сравнивались с результатами авторов статьи (Natsuga et al. 2010)). Для d11 отмечено визуальное ослабление интенсивности окраски против плектина по сравнению со здоровым донором, свечение у d11 и d5a также представляло прерывистую линию, что говорит о неравномерности экспрессии плектина (*Рисунок 32*).

Отмеченные изменения в паттерне экспрессии структурных белков могут свидетельствовать о нарушениях синтеза белка на более глубоких уровнях, в том числе о наличии мутаций в генах, кодирующих маркерные белки. Очевидно, что замеченные белковые агрегаты устойчивы к защитным механизмам протеолиза в клетке, в противном случае, они подвергались бы деградации. Как было сказано выше, простой БЭ может возникать при нарушениях экспрессии исследуемых белков дермо-эпидермального соединения (Laimer and Bauer 2015). Проведенный анализ конфокальных изображений не позволяет сделать однозначные выводы из-за невысокой четкости изображений. Однако, на основании выявленного нарушения экспрессии плектина и кератина 14 у d11 мы предположительно диагностируем простой тип БЭ. Диагноз d5a требует подтверждения с помощью окрашивания на коллаген VII.



Рисунок 31. Окрашивание антителами против цитокератина 14 кожи d11 и здорового донора (проводилось совместно с Толстолужинской Анастасией). Контрастирование ядер DAPI. Неравномерность экспрессии и образование агрегатов кератина 14 (белые стрелки) в краевой цитоплазме клеток у d11 (Б) по сравнению со здоровым контролем (А).



Рисунок 32. Описание рисунка в тексте. Окраска специфичными антителами против Krt5, 14, Plectin (Alexa 488), DAPI. Стрелками отмечено нарушение экспрессии белка. Окраска проводилась совместно с Толстолужинской Анастасией.

С помощью окрашивания кожи больного РДБЭ **da3** специфичными антителами против коллагена VII (предоставлено коллективом Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии Минздрава РФ, с которым проводится совместная работа по изучению БЭ) мы анализировали экспрессию коллагена VII и его участие в образовании якорных фибрилл, в норме соединяющих плотную пластинку базальной мембраны с компонентами дермы. По приведенным выше результатам секвенирования и литературным данным, больной da3 имеет две гетерозиготные мутации в *col7a1*, выявленные клинические проявления соответствуют диагнозу РДБЭ. а Следовательно, мы ожидали увидеть нарушения в экспрессии коллагена VII при иммуногистохимическом окрашивании. Свечение флуорохромов в коже больного da3 с РДБЭ отличалось гранулярным характером, представляло собой местами прерывистую линию, идущую вдоль дермо-эпидермальной границы, по сравнению равномерной экспрессией У здорового контроля, С что соответствовало нашим ожиданиям (Рисунок 33). Слабая экспрессия белка может быть следствием изменений в процессах транскрипции col7a1, трансляции и пост-трансляционной модификации белка. Последний процесс, в случае коллагена VII, многоэтапный, он происходит в ЭПР клетки и после секреции белка, что было описано выше. Мутации приводят к нарушениям тонкой регуляции этих процессов. Они могут выражаться как в снижении количества синтезированного проколлагена, так и в нарушенной секреции зрелого белка коллагена VII, участвующего в формировании якорных фибрилл. Это приводит к серьезным физиологическим последствиям И БЭ дистрофического типа. На основании выявленного нарушения экспрессии коллагена VII у da3 диагностировали дистрофический тип ВБЭ. Диагноз ДБЭ подтверждается результатами секвенирования (см. результат выше).



Рисунок 33. Иммунофлуоресцентное окрашивание на коллаген VII кожи здорового донора (A) и больного da3 (Б). Контрастирование ядер DAPI,

увеличение x200. Стрелками указана сниженная экспрессия коллагена VII в коже больного РДБЭ da3. Данный анализ на биоптате больного da3 проведен Рожихиным Никитой (лаборатория Карамовой А. Э.) в Государственном научном центре дерматовенерологии и косметологии Минздрава РФ (cnikvi.ru), возглавляемом Кубановым А. А. Представлено с разрешения авторов в рамках совместной работы по изучению БЭ.

#### 5. Результаты белкового иммуноблоттинга Western Blot

Вестерн-блот анализ был сделан в лаборатории совместно с Евтушенко Надеждой и представлен в работе с ее разрешения. Данный метод позволяет дать оценку экспрессии специфических белков в образце.

Белки детектировали на мембране с использованием специфичных антител к коллагену VII и b-актину. Было решено провести полуколичественную оценку результатов вестерн-блот анализа. Для этого в программе ImageJ на изображении вестерн-блота (нитроцеллюлозной мембраны) полосы соответствующего размера обводили, для каждой полосы считали интенсивность и далее вычитали фон. Отношение интенсивности контрольного и целевого белка считали в Excel, наибольшее значение было принято за единицу для удобства. Цифровые значения для всех полос заносились в таблицу (

Таблица 7).

Таблица 7. Цифровые данные обсчета вестерн-блота для здоровых доноров d118, d138 и больных РДБЭ d1, d2, da3, d4. Белок b-актин является «геном домашнего хозяйства» и был выбран в качестве контрольного белка, так как его экспрессия не меняется при данном заболевании. Наибольшее отношение интенсивности для удобства принято за единицу. Данные представлены с разрешения автора Евтушенко Надежды.

70

Донор	Инт-ть Coll7A	Инт-ть b-actin	Coll7a/b-actin	l
d118	7427,62	17083,6	0,434781685	0,825504234
d138	15964,1	30310,4	0,526686196	1
d1	3204,38	18521,8	0,173005666	0,328479591
d2	2454,15	11239,3	0,218354294	0,414581387
d3a	1799,91	9741,19	0,184773375	0,350822514
d4	2453,03	25892,8	0,094738211	0,179876009
	Донор	Числовые данны	е для диаграм	МЫ
	d118	0,8255		
	d138	1		
	d1	0,32848		
	d2	0,41458		
	d3a	0,35082		
	d4	0,17988		

На основе данных обсчета представлена диаграмма соотношения количества коллагена VII к b-актину для разных доноров (*Рисунок 34*). Как видно по высоте пиков, больные РДБЭ, имеют значительно более слабую экспрессию коллагена VII, чем здоровые доноры, что еще раз показывает, что заболевание РДБЭ характеризуется нарушениями в экспрессии коллагена VII.



Рисунок 34. Соотношение относительных количеств коллагена VII к bактину в клетках здоровых доноров d118, d138 и больных РДБЭ d1, d2, da3, d4. Представлена с разрешения автора Евтушенко Надежды.
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

дистрофический Рецессивный буллезный эпидермолиз является наследственным заболеванием с тяжелыми клиническими проявлениями. Механизмы нарушений, сопутствующих РДБЭ, тесно связаны с биологией развития и закладываются еще до рождения. Отсутствие или сниженная экспрессия коллагена VII активирует провоспалительные каскады и процессы, сопутствующие фиброзному перерождению ткани. Сопровождающие эти процессы изменения в экспрессии генов во многом похожи на паттерн возрастных изменений в коже. Это объединяет задачи по изучению патологических механизмов РДБЭ с проблемами биологии старения. Мутации *col7a1*, исследованные в данной работе, разрушают сайты сплайсинга и приводят к нарушению образования функциональной зрелой мРНК гена *col7a1*, такие мутации всегда являются патологическими. Трансляция таких аберрантных транскриптов часто приводит к серьезным нарушениям в процессах синтеза белка, а в нашем случае к удержанию интрона, образованию ПСК и деградации мРНК. При отсутствии коллагена VII в результате таких мутаций не происходит образования функциональных якорных фибрилл, что ведет к РДБЭ.

Изучение такие мутаций важно для дальнейшего исследования РДБЭ, выявления механизмов патогенеза и понимания возможных путей коррекции врожденного буллезного эпидермолиза.

## выводы

- 1. Описанные больные РДБЭ имеют рецессивные мутации в гене *col7a1*, которые приводят к нарушению синтеза белка на стадии сплайсинга пре-мРНК и симптомам РДБЭ.
- Мутации сайтов сплайсинга приводят к образованию преждевременного стоп-кодона и нонсенс-опосредованной деградации мРНК, в результате которой синтез белка значительно снижен.
- 3. В результате генетических мутаций в коже больных БЭ нарушена экспрессия структурных белков дермо-эпидермального соединения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молекулярная биология клетки. / Альбертс Б., Джонсон А., Льюис Д., Рэфф М., Робертс К., Уолтер П. — 5-е изд. — Том 2. — Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. — 1213 с.

Быков В. Л. — Частная гистология человека (краткий обзорный курс).
 — 2-е изд. —СПб.: СОТИС, 1997. — 56–70 с.

 Лыкова С.Г., Максимова Ю. В., Немчанинова О. Б., Гусева С. Н., Омигов
 В. В., Айдагулова С. В. Врожденный буллезный эпидермолиз // Архив патологии. — 2018. — № 4 (80). — 54–60 с.

4. Саркисов Д. С. Грануляционная ткань // БМЭ. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1974-1988. — Т. 6.

5. Хрущев Н. Г. Проблема происхождения фибробластов в постнатальном онтогенезе млекопитающих // Онтогенез. — 1974. — т. 5, № 1. — 3-12 с.

6. Rehwinkel J., Raes J., Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors // Trends in Biochemical Sciences. — 2006. — Vol. 31, № 11. — P. 639–646.

7. Lykke-Andersen J., Shu M. Di, Steitz J.A. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when downstream of a termination codon // Cell. — 2000. — Vol. 103  $N_{2}$  7. P. 1121–1131.

8. Atanasova V.S., Rebecca J. W., Timothy G. C., Qingqing A., Pooja L., Yok Z. K., Suma F., Ignacia G., Christina M., John A. S., Julio C. F., Andrzej S., Andrew P. Thrombospondin-1 Is a Major Activator of TGF- $\beta$  Signaling in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Fibroblasts // Journal of Investigative Dermatology. — 2019. — Vol. 139, No 7. — P. 1497-1505.e5.

9. Boltzmann L., Ludwig G., Christina K., Alfred T., Andrea B., Barbara R., Herbert B., Johann W. Pseudosyndactyly-an inflammatory and fibrotic wound healing disorder in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // JDDG - Journal of the German Society of Dermatology. — 2015. — Vol.13, № 12. — P. 1257– 1266.

10. Briggaman R.A., Wheeler C.J. The epidermal-dermal junction // J Invest Dermatol. —1975. — Vol. 65, № 1. — P. 71–84.

11. Brittingham R., Uitto J., Fertala A. High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2006. — Vol. 343, № 3. — P. 692–699.

12. Burgeson R.E. Type VII Collagen, Anchoring Fibrils, and Epidermolysis Bullosa // Journal of Investigative Dermatology. — 1993. —Vol. 101, № 3. — P. 252–255.

13. Christiano A.M., Hoffman G. G., Chung-Honet L. C., Lee S., Cheng W., Uitto J., Greenspan D. S. Structural Organization of the Human Type VII Collagen Gene (col7a1), Composed of More Exons Than Any Previously Characterized Gene // Genomics. — 1994. —Vol. 21, № 1. — P. 169–179.

14. Chung H.J., Uitto M. and J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic // NIH Public Access. — 2011. — Vol. 28, № 1. — P. 93–105.

15. Cianfarani F., De Domenico E., Nyström A., Mastroen S., Abeni D., Baldin E., Ulisse S., Uva P., Bruckner-Tuderman L., Zambruno G., Castiglia D., Odorisi T. Decorin counteracts disease progression in mice with recessive dystrophic epidermolysis bullosa // Matrix Biology. — 2019. — Vol. 81. — P. 3–16.

16. Condorelli A. G., Dellambra E., Logli E., Zambruno G., Castiglia D. Epidermolysis Bullosa-Associated Squamous Cell Carcinoma: From Pathogenesis to Therapeutic Perspectives // Int J Mol Sci. — 2019. — Vol. 20,  $N_{2}$  22. — P. 5707.

17. Dang N., Murrell D.F. Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa // Experimental Dermatology. —

2008. — Vol. 17, № 7. — P. 533–568.

18. Evans M. J., Fanucchi M. V., Miller L. A., Carlson M. A., Nishio S. J., Hyde
D. M. Reduction of collagen VII anchoring fibrils in the airway basement membrane zone of infant rhesus monkeys exposed to house dust mite // Am J
Physiol Lung Cell Mol Physiol. — 2010. — Vol. 298, № 4. — P. 543–547.

19. Fine J. Structure and antigenicity of the skin basement membrane zone // J
Cutan Pathol. — 1991. — Vol. 18, № 6. — P. 401–409.

20. Fine J., Johnson L. B., Weiner M., Suchindran C.. Gastrointestinal Complications of Inherited Epidermolysis Bullosa : Cumulative Experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry // J Pediatr Gastroenterol Nutr. — 2008. — Vol. 46,  $N_{2}$  2. — P. 147–158.

21. Fine J. D., Mph L. B. J., Rn M.W., Li K., Suchindran C.. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers : The National EB Registry experience , // Journal of American Dermatology. — 2008. — Vol. 60 № 2. — P. 203–211.

22. Fine J.D., Eady R. A. J., Bauer E. A., Briggaman R. A., Bruckner-Tuderman L., Christiano A., Heagerty A., Hintner H., Jonkman M. F., McGrath J., McGuire J., Moshell A., Shimizu H., Tadini G., Uitto J. Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the second international consensus meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa // Journal of the American Academy of Dermatology. — 2000. —Vol. 42 № 6. P. 1051–1066.

23. Ganier C., Titeux M., Gaucher S., Peltzer J., Lorc'h M., Lataillade J. J., Ishida-Yamamoto A., Hovnanian A. Intradermal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Corrects Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa in a Xenograft Model // Journal of Investigative Dermatology. — 2018. — Vol. 138 № 11. — P. 2483–2486.

24. Ghalbzouri A. El, Jonkman à M. F, Dijkman R., Maria P. Basement

Membrane Reconstruction in Human Skin Equivalents Is Regulated by Fibroblasts and/or Exogenously Activated Keratinocytes // The Journal of Investigative Dermatology. — 2005. — Vol. 124. — P. 79–86.

25. Guerra L., Odorisio T., Zambruno G., Castiglia D. Stromal microenvironment in type VII collagen-deficient skin : The ground for squamous cell carcinoma development // Matrix Biology. — 2017. — Vol. 63. — P. 1–10.

26. Hainzl S., Peking P., Kocher T., Murauer E. M, Larcher F., Rio M. D., Duarte B., Steiner M., Klausegger A., Johann W, Reichelt J., Koller U. COL7A1 editing via CRISPR/Cas9 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // Molecular Therapy. — 2017. — Vol. 25 № 11. — P. 2573–2584.

27. Hammami-Hauasli N., Kalinke D. U., Schumann H., Kalinke U., Pontz B F., Anton-Lamprecht I., Pulkkinen L., Zimmermann M., Uitto J., Bruckner-Tuderman L. A Combination of a Common Splice Site Mutation and a Frameshift Mutation in the COL7A1 Gene: Absence of Functional Collagen VII in Keratinocytes and Skin // Journal of Investigative Dermatology. — 1997. — Vol. 109  $N_{2}$  3. — P. 384–389.

28. Hashikawa K., Hamada T., Ishii N., Fukuda S., Kuroki R., Nakama T., Hashimoto T. The compound heterozygote for new/recurrent COL7A1 mutations in a Japanese patient with bullous dermolysis of the newborn // Journal of Dermatological Science. — 2009. — Vol. 56 N 1. — P. 66–68.

29. Hirsch T., Rothoeft T., Teig N., Johann W, Scaglione D., Reichelt J., Klausegger A., Kneisz D., Romano O., Seconetti A. S., Contin R., Enzo E., Jurman I., Carulli S., Jacobsen F., Luecke T., Lehnhardt M., Fischer M., Kueckelhaus M., Quaglino D., Morgante M., Bicciato S., Bondanza S. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells // Nature Publishing Group. — 2017. — Vol. 551 № 7680. — P. 327–332.

30. Hovnanian A., Rochat A., Bodemer C., Petit E., Rivers C. A, Prost C., Fraitag S., Christiano A. M, Uitto J., Lathrop M., Barrandon Y., Prost Y. De.

Characterization of 18 New Mutations in COL7A1 in Recessive Dystrophic
Epidermolysis Bullosa Provides Evidence for Distinct Molecular Mechanisms
Underlying Defective Anchoring Fibril Formation // Am J Hum Genet. — 1997.
— Vol. 61 № 3. — P. 599–610.

31. Kahofer P., Bruckner-tuderman L., Metze D., Scheffer H., Smolle J.
Dystrophic Epidermolysis Bullosa Inversa with COL7A1 Mutations and
Absence of GDA-J / F3 Protein // Pediatric Dermatology. — 2003. —Vol. 20 №
3. — P. 243–248.

32. Kakavand Hamidi A., Moghaddam M., Hatamnejadian N., Ebrahimi A. A novel deletion and two recurrent substitutions on type VII collagen gene in seven Iranian patients with epidermolysis bullosa // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. — 2016. — Vol. 19 № 8. — P. 858–862.

33. Kern J. S., Kohlhase J., Bruckner-Tuderman L., Has C. Expanding the COL7A1 mutation database: Novel and recurrent mutations and unusual genotype - Phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa // Journal of Investigative Dermatology. — 2006. — Vol. 126 No 5. — P. 1006–1012.

34. Kim B. Yancey Adhesion Molecules. II: Interactions of Keratinocytes with Epidermal Basement Membrane // Journal of Investigative Dermatology. — 1995. — Vol. 104 № 6. — P. 1008–1014.

35. Kivirikko S., Li K., Christiano A., Uitto J. Cloning of Mouse Type VII Collagen Reveals Evolutionary Conservation of Functional Protein Domains and Genomic Organization // J Invest Dermatol. — 1996. — Vol. 106  $\mathbb{N}$  6. — P. 1300–1306.

36. Knaup J., Gruber C., Krammer B., Ziegler V., Bauer J., Verwanger T. TGF $\beta$ signaling in squamous cell carcinoma occurring in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // Analytical Cellular Pathology. — 2011. — Vol. 34 No 6. — P. 339–353. 37. Kocher T., Wagner R. N, Klausegger A., Guttmann-gruber C., Hainzl S., Bauer J. W, Reichelt J., Koller U. Improved double-nicking strategies for COL7A1 editing by homologous recombination // Molecular Therapy: Nucleic Acid. — 2019. — Vol. 18. — P. 496–507.

38. Laimer M., Bauer J.W. Hereditary epidermolysis bullosa // J Dtsch Dermatol
Ges. — 2015. — № 11 (13). — P. 1125–1133.

39. Latella M. C., Cocchiarella F., De Rosa L., Turchiano G., Gonçalves M. A. F. V., Larcher F., De Luca M., Recchia A. Correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by transposon-mediated integration of COL7A1 in transplantable patient-derived primary keratinocytes // The Journal of Investigative Dermatology. — 2017. — Vol. 137  $N_{\rm P}$  4. — P. 836–844.

40. Liao Y., Ivanova L., Zhu H., Plumer T.,Hamby C., Mehta B., Gevertz A., Christiano A. M., McGrath J. A., Cairo M. S. Cord Blood-Derived Stem Cells Suppress Fibrosis and May Prevent Malignant Progression in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa // Stem Cells. — 2018. — Vol. 36 № 12. — P. 1–12.

41. Lwin S.M., Qasim W., McGrath J. A. Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // JCI Insight. — 2019. — Vol. 4  $N_{2}$  11. — P. 0–19.

42. March O.P., Reichelt J. Gene editing for skin diseases : designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders // Exp Physiol. — 2018. — Vol. 103  $N_{2}$  4. — P. 449–455.

43. Marinkovich M.P., Keene D. R., Rimberg C.S., Burgeson R. E. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane // Developmental Dynamics. — 1993. — Vol. 197 № 4. — P. 255–267.

44. Martins V.L., Vyas J. J., Chen M., Purdie K., Mein C. A., South A. P., Storey A., McGrath J. A., O'Toole E. A. Increased invasive behaviour in cutaneous squamous cell carcinoma with loss of basement-membrane type VII collagen //

Journal of Cell Science. — 2009. — Vol. 122 № 11. — P. 1788–1799.

45. McGrath J.A., Uitto J. Rook's Textbook of Dermatology. — Изд. 8-е. — Blackwell Publishing Ltd., 2012. — Р. 1–12.

46. Murata T., Masunaga T., Ishiko A., Shimizu H., Nishikawa T. Differences in recurrent COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa: Ethnicspecific and worldwide recurrent mutations // Archives of Dermatological Research. — 2004. — Vol. 295 № 10. — P. 442–447.

47. Murrell D.F. Life with epidermolysis bullosa (EB): Etiology, diagnosis, multidisciplinary care and therapy // Journal of the American Academy of Dermatology. — 2009. — Vol. 61  $\mathbb{N}$  6. — P. 1092–1093.

48. Naso M., Uitto J., Klement J.F. Transcriptional Control of the Mouse Col7a1
Gene in Keratinocytes: Basal and Transforming Growth Factor-β Regulated
Expression // Journal of Investigative Dermatology. — 2003. — Vol. 121 № 6.
— P. 1469–1478.

49. Natsuga K., Nishie W., Akiyama M., Nakamura H., Shinkuma S., McMillan J. R., Nagasaki A., Has C., Ouchi T., Ishiko A., Hirako Y., Owaribe K., Sawamura D., Bruckner-Tuderman L., Shimizu H. Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex // Human Mutation. — 2010. — Vol. 31  $N_{2}$  3. — P. 308–316.

50. Nestle F., Meglio P., Qin J. Z., Nickoloff B. J. Skin immune sentinels in health and disease // Nat Rev Immunol. — 2009. — Vol. 9 № 10. — P. 679–691.

51. Nyström A., Bornert O., Kühl T., Gretzmeier C., Thriene K., Dengjel J., Pfister-Wartha A., Kiritsi D., Bruckner-Tuderman L. Impaired lymphoid extracellular matrix impedes antibacterial immunity in epidermolysis bullosa // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2018. — Vol. 115  $N_{\rm P}$  4. — P. E705–E714.

52. Odorisio T., di Salvio M., Orecchia, A., di Zenzo G., Piccinni E., Cianfarani

F., Travaglione A., Uva P., Bellei B., Conti A., Zambruno G., Castiglia D. Monozygotic twins discordant for recessive dystrophic epidermolysis bullosa phenotype highlight the role of TGF- $\beta$  signalling in modifying disease severity // Human Molecular Genetics. — 2014. — Vol. 23 No 15. — P. 3907–3922.

53. Peking. Therapies for epidermolysis bullosa: delivery is key // Br J Dermatol.
2019. — Vol. 180 № 1. — P. 141–148.

54. Peking P., Koller U., Duarte B., Murillas R., Wolf S., Maetzig T., Rothe M., Kocher T., Garc M., Brachtl G., Schambach A., Larcher F., Reichelt J., Bauer J. W, Murauer M. An RNA-targeted therapy for dystrophic epidermolysis bullosa // Nucleic Acids Research. — 2017. — Vol. 45 № 17. — P. 10259–10269.

55. Peking P., Koller U., Murauer E.M. Functional therapies for cutaneous wound repair in epidermolysis bullosa // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2017. — Vol. 129. — P. 330–343.

56. Petrova A., Georgiadis C., Fleck R., Allison L., Mcgrath J., Dazzi F., Di W., Qasim W. Human Mesenchymal Stromal Cells Engineered to Express Collagen VII Can Restore Anchoring Fibrils in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Skin Graft Chimeras // Journal of Investigative Dermatology. — 2020. — Vol. 140 № 1. — P. 121–131.

57. Ploetz C., Zycband E.I., Birk D.E. Collagen Fibril Assembly and Deposition in the Developing Dermis: Segmental Deposition in Extracellular Compartments // J Struct Biol. — 1991. — Vol. 106 № 1. — P. 73–81.

58. Ray M.C., Gately L.E. Basement Membrane Zone // Clin Dermatol. — 2004.
— Vol. 14 № 4. — P. 321–330.

59. Res A.D., Uitto J., Christiano A.M. Molecular basis for the dystrophic forms of epidermolysis bullosa : mutations in the type VII collagen gene // Arch Dermatol Res. — 1994. — Vol. 287 № 1. — P. 16–22.

60. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody

W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genetics in Medicine. — 2015. — Vol. 17 No 5. — P. 405–424.

61. Ryynänen J., Sollberg S., Olsen D.R., Uitto J. Transforming growth factorbeta up-regulates type VII collagen gene expression in normal and transformed epidermal keratinocytes in culture. // Biochemical And Biophysical Research Communications. — 1991. — Vol. 180  $N_{2}$  2. — P. 2–5.

62. Tamai K., Uitto J. Stem Cell Therapy for Epidermolysis Bullosa — Does It Work? // Journal of Investigative Dermatology. — 2016. — Vol. 136 № 11. — P. 2119–2121.

63. Titeux M., Pendaries V., Zanta-boussif M., Décha A., Pironon N., Tonasso L., Mejia J., Brice A., Danos O., Hovnanian A. SIN Retroviral Vectors Expressing COL7A1 Under Human Promoters for Ex Vivo Gene Therapy of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa // The American Society of Gene & Cell Therapy. — 2010. — Vol. 18 № 8. — P. 1509–1518.

64. Uitto J., Pulkkinen L. Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone // Molecular Biology Reports. — 1996. — Vol. 23 № 1. — P. 35–46.

65. Uitto J., Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: From eponyms to molecular genetic classification // Clinics in Dermatology. — 2005. — Vol. 23  $N_{2}$  1. — P. 33–40.

66. Umemoto H., Akiyama M., Domon T., Nomura T., Shinkuma S., Ito K., Asaka T., Sawamura D., Uitto J., Uo M., Kitagawa Y., Shimizu H. Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts // American Journal of Pathology. — 2012. — Vol. 181  $N_{2}$  5. — P. 1659–1671.

67. Wagner K., Hamed S., Hadley D., Gropman A., Burstein A., Escolar D., Hoffman E., Fischbeck K. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations // Annals of Neurology. — 2001.
— Vol. 49 № 6. — P. 706–711.

68. Wang C.H.S., Lee J.Y., Mcgrath J.A. Treatment of Hereditary Epidermolysis
Bullosa : Updates and Future Prospects // Am J Clin Dermatol. — 2014. — Vol.
15 № 1. — P. 1–6.

69. Woodley D., Kang, H.C., Quigley, D.A., Kim I., Wakabayashi,
Y., Ferguson-smith M., Alessandro M., Birgitte E., Akhurst R., David R.
Intravenously Injected Recombinant Human Type VII Collagen Homes to Skin
Wounds and Restores Skin Integrity of Dystrophic Epidermolysis Bullosa //
Journal of Investigative Dermatology. — 2013. — Vol. 133 № 7. — P. 1910–
1913.