

Использование CRISPR/Cas9 для нокаута аллелей гена *DES*, несущих гетерозиготные gain-of-function мутации, связанные с развитием десминопатии

Кочергин-Никитский К.С.¹, Лавров А.В.¹, Заклязьминская Е.В.², Смирнихина С.А.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 — ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»
119991, г. Москва, Абрикосовский переулок, д. 2

Наследственные кардиомиопатии характеризуются неблагоприятным прогнозом и низкой пятилетней выживаемостью пациентов с выраженной клиникой. При этом лечение, за исключением хирургического, в основном паллиативное, во многих случаях лишь трансплантация сердца может улучшить состояние пациента и прогноз. Часть наследственных кардиомиопатий ассоциирована с аутосомно-доминантными мутациями в гене *DES*, кодирующем белок промежуточных филаментов десмин, дефекты в котором ведут к развитию десминопатий с вовлечением наиболее активно работающих мышц – скелетных, миокарда, мышц дыхательной системы. Новые терапевтические подходы, основанные на методах геномного редактирования, могут позволить устранить каузативный генетический дефект. Так как имеются данные об отсутствии клинических симптомов у людей с гетерозиготными нонсенс мутациями в гене *DES*, по-видимому, имеется возможность снизить тяжесть протекания десминопатий путем нокаута мутантного аллеля в случае гетерозиготной мутации.

Целью работы являлась проверка возможности специфического нокаута аллелей гена *DES*, несущих гетерозиготные мутации, ассоциированные с десминопатиями, методами геномного редактирования. Нами был получен генетический материал трех пациентов с десминопатиями, связанными с мутациями в гене *DES* (с.330_338del, p.A337P (с.1009G>C) и p.R355P (с.1064G>C)). Направляющие РНК, совместимые с нуклеазами SaCas9 и eSpCas9(1.1), были подобраны, используя онлайн сервис Benchling, и клонированы в плазмиды, несущие соответствующие эндонуклеазы Cas9. Редактирующие плазмиды котрансфицировали в клетки HEK293T вместе с «таргетными» плазмидами, содержащими участки гена *DES* с мутациями. Анализ характерных для негомологичного соединения концов инделов в выделенной из клеток спустя 48 часов после трансфекции тотальной ДНК проводился посредством TIDE-анализа полученных сиквенсов целевых участков, либо методом T7E1 анализа. Наибольшая средняя эффективность 2,22% (до 8,06%) показана при использовании sgRNA на мутацию с.330_338del в комбинации с eSpCas9(1.1). Эффективность других комбинаций направляющих РНК и Cas9 не превышала 3%. Достигнутая эффективность нокаута очевидно недостаточна для коррекции десминопатии на уровне организма. Необходимость специфического нокаутирования мутантных аллелей не позволяет использовать другие направляющие РНК для CRISPR/Cas9, поэтому необходимо совершенствование разработанных систем для повышения их эффективности либо использование новых, более эффективных, направляемых нуклеаз.

Ключевые слова: кардиомиопатия, десминопатия, ген *DES*, десмин, геномное редактирование, CRISPR/Cas9.

Для цитирования: Кочергин-Никитский К.С., Лавров А.В., Заклязьминская Е.В., Смирнихина С.А. Использование CRISPR/Cas9 для нокаута аллелей гена *DES*, несущих гетерозиготные gain-of-function мутации, связанные с развитием десминопатии. *Медицинская генетика* 2021; 20(7): 37-44.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.37-44

Автор для корреспонденции: Кочергин-Никитский К.С.; e-mail: KNCS@med-gen.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 23.06.2021.

CRISPR/Cas9 mediated knockout of the *DES* gene alleles with desminopathy-related heterozygous gain-of-function mutations

Kochergin-Nikitsky K.S.¹, Lavrov A.V.¹, Zaklyazminskaya E.V.², Smirnikhina S.A.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics,
1, Moskvorechie str., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — Petrovsky Russian Research Center of Surgery
2, Abrikosovsky pereulok, Moscow, 119991, Russian Federation

Hereditary cardiomyopathies are characterized by the generally poor prognosis and low 5-year survival of patients with severe symptoms. Besides surgical approaches, cardiomyopathy therapy mainly palliative and often heart transplantation is the only option to

improve patient state and prognosis. Some of these pathologies are associated with the autosomal-dominant *DES* gene mutations. *DES* encodes intermediate filaments protein desmin, which defects causes desminopathies involving most active muscles such as skeletal muscles, myocardium and respiratory muscles. New therapeutic based on genome editing approaches could be used to correct causative genetic defect. There are data that heterozygous nonsense mutations in *DES* gene may be asymptomatic. Thus there is, apparently, a possibility to decrease severity of desminopathy using mutant allele knockout. **Purpose.** The aim of this work was to test the possibility of specific knockout of the *DES* gene alleles with heterozygous desminopathy-associated mutations by means of genome editing methods. **Materials.** We received genetic materials of three patients with desminopathy caused by *DES* gene mutations (c.330_338del, p.A337P (c.1009G>C) и p.R355P (c.1064G>C)). Guide RNA, compatible with nucleases SaCas9 and eSpCas9(1.1) were designed using online service Benchling and cloned into plasmids with corresponding Cas9 nucleases. Editing plasmids were cotransfected into HEK293T cells with "target" plasmids, containing *DES* gene sites with mutations. NHEJ-produced indels were assessed using TIDE-analysis with amplified and sequenced sites or using T7E1 analysis. **Results.** Combination sgRNA for c.330_338del with eSpCas9(1.1) demonstrated most mean efficiency of 2,22% (up to 8,06%). Others combinations of sgRNAs and Cas9 efficiency did not overcome 3%. **Conclusions.** Achieved knockout efficiency is evidently not enough for organism-level desminopathy correction. The need for specific knockout of mutated alleles does not allow usage of different guide RNAs for CRISPR/Cas9, so it is necessary to improve the developed systems to increase their efficiency or to use new, more efficient, targeted nucleases.

Key words: cardiomyopathy, desminopathy, DES, desmin, genome editing, CRISPR/Cas9

For citation: Kochergin-Nikitsky K.S., Lavrov A.V., Zaklyazminskaya E.V., Smirnikhina S.A. CRISPR/Cas9 mediated knockout of the *DES* gene alleles with desminopathy-related heterozygous gain-of-function mutations. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(7): 27-44. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.07.37-44

Corresponding author: K.S. Kochergin-Nikitsky; **e-mail:** KNCS@med-gen.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 23.06.2021

Введение

Первичные кардиомиопатии (КМП) представляют собой гетерогенную группу прогрессирующих заболеваний сердца, часто наследственных, связанных со структурными и функциональными изменениями миокарда, и ведущих к развитию сердечной недостаточности. Впервые предложенный Уоллесом Бригденом в 1957 г. термин «кардиомиопатия» был принят в 1968 г. ВОЗ и впоследствии подвергался многим ревизиям с введением новых номенклатур и систематик [1, 2]. Наиболее всеобъемлющей в настоящее время является номенклатура MOGE(s) [3].

Один из многих генов, связанных с генетически обусловленными КМП, — ген *DES* (2q35). Этот ген кодирует белок десмин, имеющий массу 53kDa (470 а.а.), — тканеспецифичный белок промежуточных филаментов III типа, преимущественно экспрессируемый в скелетных и сердечных миоцитах [4]. Данный белок, являясь критически важным компонентом цитоскелета, поддерживает механическую целостность мышечных волокон, обеспечивает передачу усилия в районе Z-дисков, взаимосвязь и пространственные взаимодействия сократительного аппарата с различными клеточными органеллами, а также наличие поблизости от сократительного аппарата необходимых для его работы митохондрий, участвует в поддержании нормальной архитектуры миофибрилл и связывает саркомеры

с сарколеммой и внеклеточным матриксом. Десмин играет важную роль в механохимическом сигналинге и, как важный компонент волокон Пуркинье, необходим для согласованного сокращения миокарда [5, 6]. Дефекты данного белка могут приводить к развитию мультисистемных нарушений, называемых десминопатиями и характеризующихся общей мышечной слабостью вплоть до тетрапарезов с вовлечением дыхательных мышц и развитием дыхательной недостаточности, аритмий и КМП [5, 7]. По-видимому, десмин необходим при регенерации мышечных волокон [8], а его дефект или отсутствие приводят к возникновению множественных повреждений, дезорганизации и дезинтеграции миофибрилл, нарушению выравнивания в районах Z-дисков в активно работающих скелетных и сердечных мышцах [4].

Частым симптомом КМП является накопление в миоцитах под сарколеммой и между миофибриллами десмин-позитивных амилоидо-подобных телец — включений, которые могут быть ассоциированы с сердечной недостаточностью [6].

Примерно 80% десминопатий наследуются аутомно-доминантно с полной пенетрантностью [9, 10]. Вызывающие их мутации, в основном являющиеся миссенс- и нонсенс-вариантами [11], расположены преимущественно в участке гена *DES*, кодирую-

шем 2В регион белка, и ассоциированы как со скелетными, так и с сердечными миопатиями [7, 12, 13], в то время как изолированные заболевания миокарда часто связаны с мутациями в участках, кодирующих 1В, «головной» и «хвостовой» домены. Примерно у 50% носителей мутаций в гене *DES* развивается КМП, преимущественно дилатационная (ДКМП) (с такими мутациями связывают 1-2% от всех случаев ДКМП) и ограничительная (рестриктивная, РКМП) (до 13% генетически обусловленных случаев РКМП) [7, 14].

Стандартные подходы к терапии наследственных форм КМП, так же, как и при любой другой КМП, в основном, неспецифические и паллиативные, имеющие своей целью замедление прогрессирования заболевания и предотвращение развития сердечной недостаточности. Хотя в ряде случаев оперативные подходы позволяют добиваться значительного улучшения, для многих пациентов трансплантация сердца остается единственным решением, позволяющим улучшить состояние и прогноз [15]. Новые таргетные терапевтические подходы могли бы быть весьма полезными в этой области.

Различные научные коллективы сообщали о многочисленных попытках разработки генотерапевтических подходов к лечению десминопатий и десмин-зависимых КМП. Так как ген *DES* состоит из девяти экзонов с общей длиной 1413 п.н., потенциально возможна его доставка в клетку, содержащую мутированную копию, путем трансфекции или трансдукции для дальнейшей продукции функционального белка. Ранее несколько групп производили доставку копий генов, связанных с десминопатиями (в том числе шаперонов, связывающихся с десмином), с помощью векторных систем на основе аденоассоциированного вируса (ААВ). В результате удавалось продемонстрировать облегчение фенотипа КМП у десмин-дефицитных модельных мышей, либо снижение маркеров КМП в модельных клеточных линиях [16, 17].

Геномное редактирование – модификация внутриклеточной ДНК посредством направляемых эндонуклеаз, таких как TALEN, ZFN и CRISPR/Cas9, – относительно новое и многообещающее решение, в том числе, для коррекции различных патологических мутаций. Среди прочих, система CRISPR/Cas9 сравнительно простая и не слишком дорогостоящая. Имеется лишь один специфический компонент: направляющие РНК – короткие молекулы РНК, направляющие нуклеазу Cas9 к интересующему локусу, где фермент расщепляет ДНК с образованием двухцепочечного разрыва, который далее репарируется по пути гомологической репарации (HDR) либо негомологического со-

единения концов (NHEJ). Будучи довольно точным методом, HDR обычно используется для вставки фрагментов генов либо точного редактирования нуклеотидной последовательности с использованием молекулы донорной ДНК в качестве образца для репарации. Однако данный путь репарации активен только в части S и в G2 фазах клеточного цикла и отличается низкой эффективностью. Более эффективный NHEJ подвержен случайным ошибкам, в результате которых в отредактированной ДНК остаются короткие инсерции и делеции (инделлы), и используется преимущественно для нокаута генов [18].

Нокаут аллеля гена *DES*, несущего мутацию, связанную с развитием десминопатии, с использованием методов геномного редактирования, может быть эффективным подходом, позволяющим уменьшить тяжесть протекания связанных заболеваний. Показано, что гетерозиготные нонсенс мутации в этом гене не приводят к развитию тяжелого фенотипа десминопатии и хорошо переносятся. McLaughlin с соавт. в 2013 г. описали случай десминопатии с вовлечением скелетных мышц и развитием ДКМП у 27-летней женщины. Ее брат, у которого аналогичные симптомы диагностировали в 14 лет, умер в 19. В то же время, родители в возрасте более 50 лет не демонстрировали симптомов заболевания. Секвенирование образцов ДНК всех членов семьи позволило выявить, что оба родителя являлись носителями одной из двух мутаций в гене *DES*: с. 600delG (p. Lys201ArgfsX20 и с.1285C>T (p.Arg429X), брат и сестра получили оба мутантных аллеля как компунд-гетерозиготы (рис. 1) [19].

Таким образом, при гетерозиготной миссенс мутации гена *DES*, приводящей к развитию десминопатии и десмин-зависимой КМП, нокаут аллеля с такой мутацией может оказаться полезным, так как, по всей видимости, одной нормальной копии гена достаточно для сохранения функции десмина.

Цель данной работы состояла в оценке возможности и эффективности таргетного нокаута аллеля гена *DES*, несущего одну из трех мутаций с доминантно-негативным проявлением, посредством системы CRISPR/Cas9.

Методы

Пациенты

Нами был получен генетический материал от трех пациентов от 23 до 37 лет с различными фенотипами, связанными с мутациями гена *DES*, в том числе прогрессирующей мышечной дистрофией (ПМД) и КМП. Все пациенты имели гетерозиготные мутации в гене *DES*. В то время, как у пациента с мутацией *DES* N/p.

A337P (с. 1009G>C) наблюдали только ПМД, у остальных дополнительно была выявлена КМП (некомпактный миокард левого желудочка (НМЛЖ) при мутации p.R355P (с.1064G>C); НМЛЖ и ДКМП при мутации *DES* N/с.330_338del) (табл. 1). Образцы ДНК всех пациентов были получены из ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского», где данные пациенты наблюдались.

Дизайн направляющих РНК

Мы подобрали четыре различных направляющих РНК, специфичных локусам гена *DES* с мутациями. Дизайн осуществлялся с использованием свободно-

го программного обеспечения The CRISPR Guide RNA design tool, доступного в составе онлайн сервиса Benchling [Benchling Biology Software <https://benchling.com>]. Предиктивные показатели целевой и нецелевой активности направляющих РНК рассчитывали с использованием вышеуказанного программного обеспечения (табл. 2).

Плазмиды

Так как клеточная линия HEK293T содержит ген *DES* дикого типа, все эксперименты были проведены на плаزمиде, называемых “таргетными”, содержащих фрагменты гена *DES*, с таргетными мутациями (экзоны 1, 2 и 6), которые были сконструированы на основе коммерческих линейаризованных рGEM-T векторов (Promega corp., США). ПЦР ампликоны, соответствующие интересующим локусам (516 п.н., 371 п.н. и 389 п.н.) очищали из агарозного геля с помощью набора (Cleanup Mini, Евrogen, РФ) и лигировали в рGEM-T вектор в соответствии с инструкциями производителя. Было получено 8 “таргетных” плазмид, содержащих три различных локуса *DES* с мутациями и дикого типа (wt). Две плазмиды, содержащие Cas9 (eSpCas9(1.1) и SaCas9) были получены в дар от Feng Zhang (Addgene #71814 и #61591 соответственно). eSpCas9(1.1) выбрана для проведения работы как обладающая низкой нецелевой активностью по сравнению с SpCas9 дикого типа при схожей целевой активности. SaCas9 при сопоставимой целевой активности с SpCas9 имеет более короткую кодирующую последовательность (3156 п.н.)

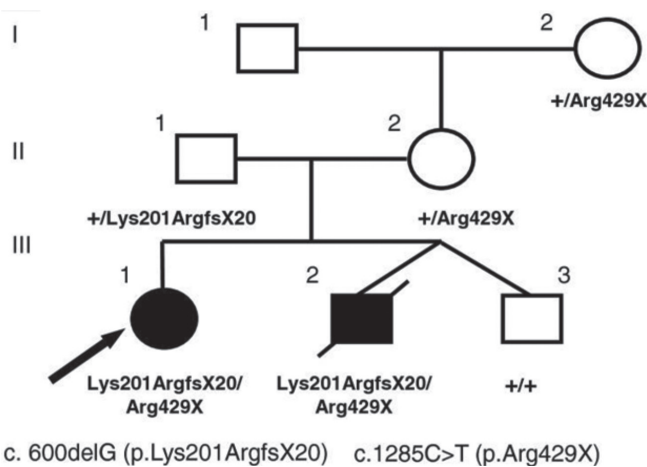


Рис. 1. Сегрегация и характеристика *DES* вариантов [19].

Таблица 1

Мутации гена *DES*, скорректированные в работе

Мутация	Тип	Возраст пациента	Пол	Зиготность	Патология
<i>DES</i> с.330_338del	Миссенс	23	М	Гетерозигота	ПМД, НМЛЖ, ДКМП
<i>DES</i> p.A337P (с.1009G>C)	Миссенс	37	Ж	Гетерозигота	ПМД
<i>DES</i> p.R355P (с.1064G>C)	Миссенс	26	Ж	Гетерозигота	ПМД, НМЛЖ

Примечание: ПМД – прогрессирующая миодистрофия; НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка; ДКМП – дилатационная кардиомиопатия.

Таблица 2

Выбранные направляющие РНК

sgRNA	Последовательность, 5’-3’	Совместимая Cas9	Оценка целевой активности	Оценка нецелевой активности
sgE1del	GATTGAGCTCCACCTTCTCGT	eSpCas9(1.1)	57,7	80,3
sg1009sp	GCTGCGAGATTGACcCCCTGA	eSpCas9(1.1)	58,7	84,4
sg1009sa	GACACCTGCGAGATTGACcCC	SaCas9	66,0	95,0
sg1064sa	GATTGGAGGACcATTGCCA	SaCas9	65,5	95,0

более подходящую для использования в составе рААВ векторов.

Были собраны четыре плазмиды, содержащие различные направляющие РНК и соответствующую нуклеазу Cas9. Плазмидную ДНК выделяли и очищали с использованием наборов ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Культуры клеток и трансфекция

Клеточная линия НЕК293Т получена в дар от Скоблова М.Ю. (лаборатория функциональной геномики, ФГБНУ «МГНЦ»). Данную клеточную линию культивировали в среде DMEM (Панэко, Россия) с добавлением бычьей эмбриональной сыворотки до 10% (РАА Laboratories GmbH, Австрия), а также смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин (100U/мл, 100мкг/мл) и 4 мМ L-глутамина (Панэко, Россия). Трансфекцию производили с использованием препарата Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Кратко: по 5,8 мкг (в одну лунку 12-луночного планшета, $\sim 2 \times 10^5$ клеток) каждой из плазмид, содержащих нуклеазу Cas9 и направляющую РНК, котрансфицировали с 0,6 мкг «таргетной» плазмиды (содержащей мутантный локус либо локус дикого типа).

Последующий анализ эффективности формирования инделов на встроенных в плазмиды локусах гена *DES* проводили после 48 часов экспозиции.

ПЦР и TIDE анализ на локусах *DES* в составе «таргетных» плазмид

Тотальную ДНК из клеток НЕК293Т изолировали спустя 48 часов после трансфекции с использованием набора Quick-gDNATM Miniprep Kit (Zymo Research, США). ПЦР проводили с праймером, специфичным исследуемому локусу гена *DES* (табл. 3), и праймером, специфичным последовательности несущей этот локус плазмиды pGEM-SP6.R: 5'-GAATACTCAAGCTATGCATCCAACG-3' для обеспечения амплификации только со вставленного

в плазмиду локуса, но не хромосомного. Реакционная смесь содержала 0,04 ЕА/мкл Taq-полимеразы, 1хTaq буфер, 0,3 мкл дНТФ (Евроген, Россия) и по 100 нг каждого образца ДНК на 50 мкл смеси. Использовался амплификатор C1000 Thermal Cycler (BioRad, США) со следующей программой: 95°C x 5'; (95°C x 15'', 60°C x 10'', 72°C x 40'') x 35; 72°C x 5'.

Аmplифицированные участки гена *DES* секвенировали по Сэнгеру с использованием как прямого, так и обратного праймеров. Полученные хроматограммы использовали для попарного сравнения (мутированный локус к локусу дикого типа) в TIDE (Tracking Indels by decomposition) анализе для количественной оценки эффективности работы системы по проценту сформировавшихся инделов [20].

T7E1 анализ

Продукт ПЦР очищали из 1% агарозного геля с использованием набора Cleanup Mini Kit (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Очищенные ампликоны (200 нг) смешивали с 2 мкл 10хNEBuffer (NEB Inc., Великобритания), объем смеси доводили до 19 мкл деионизованной водой. После этого продукт ПЦР подвергали денатурации с последующей гибридизацией цепей ДНК ампликонов случайным образом для образования двухцепочечных гетеродуплексов между редактированными и нередитированными цепями ДНК, для чего использовали следующий протокол: 95°C x 5 мин; быстрое снижение температуры (2°C в секунду) с 95°C до 85°C и далее медленное снижение температуры до комнатной по 0,1°C в секунду. После регибридизации к смеси добавляли 1 мкл T7 эндонуклеазы-1 (NEB Inc., Великобритания) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для разрезания гетеродуплексов по неспаренным нуклеотидам в районе редактирования. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мкл 0,25М ЭДТА с последующим электрофорезом в 2,5 % агарозном геле для визуализации результатов. Количественную оценку относительной интенсивности «разрезанных» и «не-разрезанных» полос проводили с использованием

Таблица 3

Праймеры, специфичные локусам гена *DES*

Локус	Праймер	Последовательность, 5' – 3'
Exon 1 (c.330_338del)	DES-E1F	AGAAAGAGGAGTCTGGGGTGCC
Exon 5 (p.A337P (c.1009G>C))	DES-E5F	ATGCCCAGGAACCCCTGATT
Exon 6 (p.R355P (c.1064G>C))	DES-E6F	GAGCCTCCTGGGGACAGAAATG

программного обеспечения ImageJ. Долю инделов рассчитывали по формуле:

$$1 - \sqrt{1 - \frac{b+c}{a+b+c}}$$

где a — измеренная плотность пикселей в полосе, соответствующей «неразрезанному» продукту, b и c — плотность пикселей в «порезанных» полосах.

Статистическая обработка

У тест Манна-Уитни был использован для расчета статистической разницы в эффективности формирования инделов между «мутантными» локусами гена *DES* и соответствующими локусами дикого типа. Был установлен уровень значимости 0,05. Все расчеты и статистический анализ производились в программе STATISTICA 32 версии 10 (Dell Inc., США).

Результаты

Мы оценили эффективность нокаута мутантных аллелей гена *DES*, рассчитанную как частота образования инделов системой CRISPR/Cas9 в участках гена

с мутациями, полученных от трех пациентов с различными проявлениями десминопатии, интегрированных в «таргетные» плазмиды.

Так как локус гена *DES* вблизи от мутации с.1009G>C (p.A337P) содержит PAM последовательности как для SpCas9, так и для SaCas9, нам удалось подобрать подходящие направляющие РНК для обеих нуклеаз: sg1009sa и sg1009sp. Другие локусы с целевыми мутациями содержат только одну подходящую PAM последовательность: для SpCas9 около *DES* с.330_338del (sgE1del) и для SaCas9 около *DES* с.1064G>C (R355P) (sg1064sa) (табл. 2).

При использовании TIDE анализа, обнаружили частоту формирования инделов ниже 1,11% для комбинаций eSpCas9(1.1)/sgE1del, eSpCas9(1.1)/sg1009sp и SaCas9/sg1009sa (рис. 2). Средняя частота для этих трех комбинаций составила 1,11%, 0,66% и 0,50% соответственно для мутированного локуса и 0,70%, 0,45% и 0,13% соответственно для локуса дикого типа, демонстрируя отсутствие значимой разницы между мутированными и локусами ($p > 0,05$).

Более эффективной оказалась комбинация SaCas9/sg1064sa, для которой была показана средняя частота

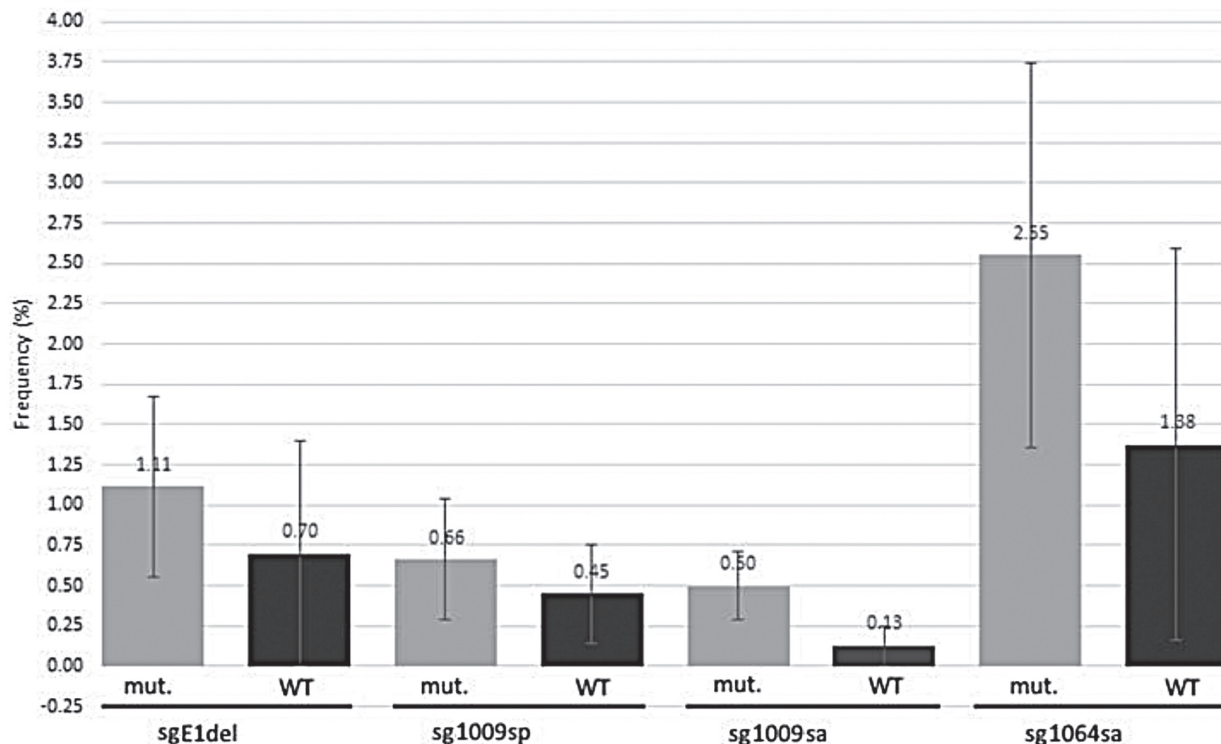


Рис. 2. Частоты инделов, продуцированных Cas9 с направляющими РНК к сайтам гена *DES*, оцененные посредством TIDE анализа. Результаты представлены как среднее со стандартной ошибкой среднего. Mut – локус с мутацией, WT – локус дикого типа.

инделов 2,22% (колебавшаяся от 1,1 до 5,0%) для локуса с мутацией *DES* с.1064G>C (p.R355P) (рис. 2). Хотя в этом случае средняя частота инделов для локуса дикого типа была в целом ниже, значимую разницу показать все же не удалось.

Наличие инделов, продуцированных после применения SaCas9/sg1064sa на вышеуказанном локусе, было дополнительно оценено с применением T7E1 анализа. Частота формирования инделов колебалась от 2,1% до 8,06% на целевом локусе и не выявлялась на том же локусе, но без мутации (рис. 3).

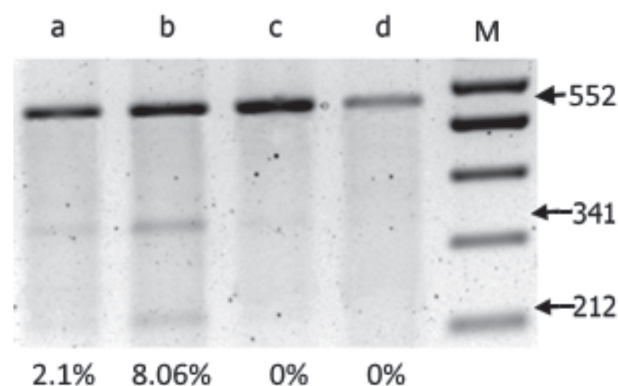


Рис. 3. T7E1 анализ доли инделов в локусах гена *DES* с (a, b) и без (c, d) мутации с. 1064G>C (p. R355P). М – 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия).

Обсуждение

Несмотря на быструю эволюцию методов и подходов в области генной терапии, нам не известны работы, посвященные использованию методов геномного редактирования для коррекции мутаций при десминопатиях.

Мутация-специфический подход имеет некоторые ограничения, так как необходимо подобрать такие направляющие РНК, которые взаимодействовали бы только с мутантным аллелем. Подбор возможных направляющих РНК ограничен присутствием РАМ последовательности рядом с мутацией. Зачастую эти ограничения не позволяют подобрать максимально эффективные из доступных направляющих РНК эмпирическим путем. Специализированное программное обеспечение (такое как Synthego Design Tool (<https://design.synthego.com>) или Broad Institute GPP sgRNA Designer (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>), предназначенное для дизайна направляющих РНК обычно позволяет рассчитывать *in silico* их целевую и нецелевую активность для предсказания активности и специфичности. Из короткого списка подходящих направляющих РНК мы смогли отобрать лишь четыре (рис. 4) с относительно низкими предсказанными индексами неспецифической активности (табл. 2).

Рассчитанные *in silico* оценки эффективности и специфичности не следует рассматривать как ис-

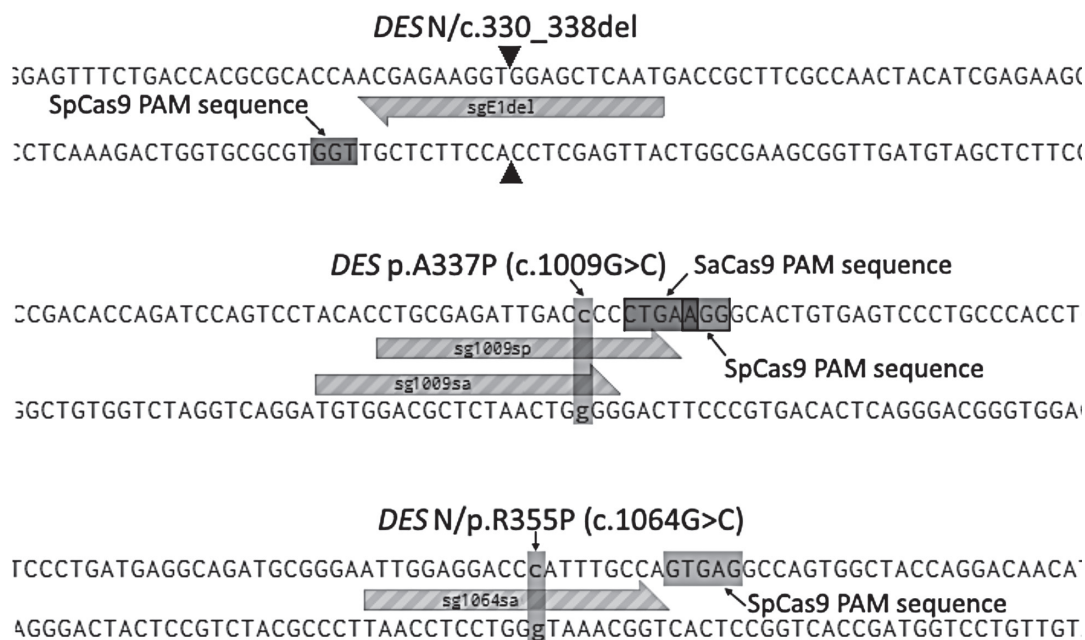


Рис. 4. Локализация выбранных направляющих РНК.

тину в последней инстанции. Во многих случаях набор подходящих направляющих РНК должен быть проверен в эксперименте для выбора наиболее эффективных. Однако относительно низкая рассчитанная целевая активность выбранных направляющих РНК, по-видимому, является истинной: максимальная эффективность нокаута в экспериментах составила лишь 8,06% для sg1064sa, а средняя частота инделов не превышала 5%.

Показанной частоты нокаута аллеля будет, по-видимому, недостаточно для терапевтического эффекта. Поскольку целью выбранного подхода является нокаут аллелей с мутациями, экспрессия белкового продукта с которых приводит, в том числе, к нарушению функции десмина, синтезируемого с нормальной копии гена, низкая эффективность системы, очевидно, не позволит существенно снизить нагрузку от патологического белка. Максимальная эффективность, которой нам удалось достичь в этой работе, может быть достаточной для экспериментов на клеточных линиях, где допустима селекция клеток, но очевидно недостаточна для коррекции десминопатии *in vivo*, особенно учитывая мультисистемный характер этой патологии, доминантность большинства каузативных мутаций и склонность мутантного десмина ингибировать или перегружать убиквитин-зависимую протеасомальную систему с накоплением цитотоксичных агрегатов дефектного десмина, включающих молекулы нормального десмина [5, 6], частое вовлечение миокарда и дыхательных мышц.

Постоянно развивающиеся методы геномного редактирования, а также доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro* и *in vivo*, в будущем, без сомнения, позволят выбирать более эффективные подходы к нокауту аллелей генов. Несмотря на кажущуюся очевидность использования подхода, основанного на нокауте аллеля с gain-of-function мутацией, возможно в будущем такие мутации все же будет целесообразнее корректировать с использованием новых инструментов, таких как редакторы оснований или праймированное редактирование.

Литература/References

- McKenna W.J., Maron B.J., Thiene G. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies. *Circulation Research* 2017;121:722–30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>.
- Elliott P., Andersson B., Arbustini E., et al. Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 2008;29:270–6. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm342>.
- Westphal J.G., Rigopoulos A.G., Bakogiannis C., et al. The MOGE(S) classification for cardiomyopathies: current status and future outlook. *Heart Failure Reviews* 2017;22:743–52. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9641-4>.
- Paulin D., Li Z. Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* 2004;301:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>.
- Goldfarb L.G., Dalakas M.C. Tragedy in a heartbeat: Malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *Journal of Clinical Investigation* 2009;119:1806–13. <https://doi.org/10.1172/JCI38027>.
- McLendon P.M., Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy: An unfolding story. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2011;301. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00601.2011>.
- van Spaendonck-Zwarts K.Y., van Hessem L., Jongbloed J.D.H., et al. Desmin-related myopathy. *Clinical Genetics* 2011;80:354–66. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01512.x>.
- Li Z., Mericskay M., Agbulut O., et al. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 1997;139:129–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.129>.
- Goldfarb L.G., Park K.Y., Cervenákova L., et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature Genetics* 1998;19:402–3. <https://doi.org/10.1038/1300>.
- Arbustini E., Pasotti M., Pilotto A., et al. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *European Journal of Heart Failure* 2006;8:477–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2005.11.003>.
- HGMD® DES gene result n.d. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=DES> (accessed September 14, 2020).
- Capetanaki Y., Papatheanasiou S., Diokmetzidou A., et al. Desmin related disease: A matter of cell survival failure. *Current Opinion in Cell Biology* 2015;32:113–20. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004>.
- Goldfarb L.G., Olivé M., Vicart P., et al. Intermediate filament diseases: Desminopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008;642:131–64. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84847-1_11.
- Taylor M.R.G., Slavov D., Ku L., et al. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2007;115:1244–51. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646778>.
- Hunt S.A., Abraham W.T., Chin M.H., et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult. *Circulation* 2005;112. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.167586>.
- Heckmann M.B., Bauer R., Jungmann A., et al. AAV9-mediated gene transfer of desmin ameliorates cardiomyopathy in desmin-deficient mice. *Gene Therapy* 2016;23:673–9. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.40>.
- Wang X., Klevitsky R., Huang W., et al. α B-Crystallin Modulates Protein Aggregation of Abnormal Desmin. *Circulation Research* 2003;93:998–1005. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000102401.77712.ED>.
- Pawelczak K.S., Gavande N.S., Vander Vere-Carozza P.S., et al. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. *ACS Chemical Biology* 2018;13:389–96. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00777>.
- McLaughlin H.M., Kelly M.A., Hawley P.P., et al. Compound heterozygosity of predicted loss-of-function DES variants in a family with recessive desminopathy. *BMC Medical Genetics* 2013;14:68. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-68>.
- Brinkman E.K., Chen T., Amendola M., et al. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research* 2014;42. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>.