

ПРЕД- И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В ПРОГРАММЕ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ

И.А. Яковлев^{1,2}, Р.В. Деев^{1,2}, В.В. Соловьева², А.А. Ризванов², А.А. Исаев¹

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Pre- and posttranscriptional genetic information modification in muscular dystrophy treatment

I.A. Yakovlev^{1,2}, R.V. Deev^{1,2}, V.V. Solovyeva², A.A. Rizvanov², A.A. Isaev¹

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia.

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Сегодня имеется целый ряд генотерапевтических методов для восстановления функции белка утраченной в результате мутации, проводится большое количество как доклинических, так и клинических исследований безопасности и эффективности препаратов-кандидатов, которые должны позволить осуществить этиотропный подход к лечению наследственных заболеваний. Одной из самых распространенных и социально значимых групп генетических болезней является мышечная дистрофия, включающая в себя такие заболевания как миодистрофия Дюшенна и дисферлинопатия. Для этих заболеваний пока не найдено эффективного метода генной терапии, несмотря на значительный объем исследований в этой области.

Настоящий обзор призван рассмотреть основные генотерапевтические стратегии в лечении миодистрофий, а именно пред- и посттранскрипционную модификацию биосинтетической (генетической) информации и проанализировать наиболее перспективные из них.

Ключевые слова: генная терапия, мышечные дистрофии, миодистрофия Дюшенна, дисферлинопатия, клинические исследования, транс-сплайсинг, экзон-скиппинг.

Введение

С начала XXI века генная терапия (ГТ) является одной из самых бурно развивающихся отраслей современной медицины. Ее основное направление — разработка эффективных решений для лечения наследственных заболеваний, поскольку только генотерапевтические методы позволяют воздействовать собственно на причину этих заболеваний. В совокупности с тем, что врожденная патология зачастую является причиной ранней смертности, а также инвалидизации в трудоспособном возрасте ГТ приобретает не только научную, медицинскую, но и социальную значимость. Из огромного количества наследственных заболеваний одной из наиболее распространенных является группа мышечных дистрофий, в которую входят такие тяжелые состояния как миодистрофия Дюшенна (МДД), миотоническая дистрофия, поясно-конечностные мышечные дистрофии и др.

Поиск оптимального генотерапевтического решения для пациентов с данными заболеваниями осложняется большими размерами генов. Например, ген *DYSF*, кодирующий белок дисферлин, имеет размер 6243 пар нуклеотидов (п. н.) и состоит из 55 экзонов [1], ген *DMD*, кодирующий дистрофин, состоит из 79 экзонов и является самым большим геном в природе — 2,4 млн п. н. [2]. Это обстоятельство ставит перед исследователями проблему создания эффективной генно-терапевтической технологии, а также способа доставки терапевтиче-

Nowadays, a whole range of genetherapeutic methods is being used to restore a lost protein function due to mutation, a big number of preclinical and clinical studies of potential drugs that may allow to implement an etiotropic approach is being performed. One of the most prevalent and socially significant groups of genetic pathologies is muscular dystrophy, including such diseases as Duchenne muscular dystrophy and dysferlinopathy. Despite a large number of studies in this field, there is no effective method of gene therapy for these diseases yet.

This work is intended to review main genetherapeutic methods in myodystrophy treatment, especially pre- and posttranscriptional genetic (biosynthetic) information modification, and analyze most optimal of them.

Keywords: gene therapy, muscular dystrophy, Duchenne myodystrophy, dysferlinopathy, clinical trials, trans-splicing, exon-skipping.

ских конструкций. Существует несколько подходов, позволяющих произвести восстановление функциональности мутантного белка: внесение полного гена или мини-гена (генный трансфер), коррекция генома или модификация процесса транскрипции. Каждый из методов ограничен возможностями векторов (емкость, иммуногенность, эффективность проникновения через клеточную мембрану и т.д.), а также размером гена, который необходимо редактировать или доставить в клетку. На сегодняшний день самыми безопасными и универсальными (способны трансдуцировать любые клетки на любой стадии деления) считают векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ) [3]. Основным недостатком рААВ является ограничение размера трансгена (не более 4,7 тыс. п. н.), что меньше размера генов, мутации в которых обуславливают развитие миопатий. В случае дистрофина возможно использование мини-гена или удаление участков генетической информации посредством пропуска экзонов, что позволяет получить усеченный, но функциональный белок. Для дисферлина в настоящее время не найдена возможность сохранить его работоспособность при изменении структуры, за исключением пропуска 32 экзона, когда функциональность белка была частично восстановлена [4, 5, 6]. Таким образом, в терапии миодистрофий рассматривают методы, заключающиеся в использовании сравнительно небольших молекул для редактирования генома или пост-транскрипционной генетической информации.

Методы генной терапии

Традиционно, под генной терапией понималось внедрение в клетку непосредственно какого-либо гена или мини-гена. Но учитывая то, что технологии геномного редактирования и рекомбинации РНК все чаще рассматриваются исследователями как подходы к лечению различных групп заболеваний, а некоторые методики использованы для разработок лекарственных средств и проходят клинические исследования, следует расширить понятие «генная терапия» и включить в него вышеперечисленные методы. Таким образом, генную терапию можно определить, как комплекс методов, включающий в себя внесение в клетку полного гена или его фрагмента, способы геномного редактирования и рекомбинацию РНК, общей целью которых является восстановление утраченной в результате мутации функции белка, либо создание новой функции для достижения терапевтического эффекта.

Предложенная в 1987 г. Брайаном Сауэром технология Cre-Lox-опосредованной рекомбинации позволяет инициировать экспрессию генов в клетках млекопитающих путем разрезания целевых участков ДНК с помощью Cre-рекомбиназы [7]. В 1992 г. группой ученых под руководством Пола Орбана эта технология была впервые использована для сайт-специфичной рекомбинации ДНК у мышей [8]. В 1998 г. был применен метод, основанный на работе Zn-фингерных эндонуклеаз (Zn-finger nuclease, ZFN) и Zn-фингерных белков, специфичных к определенным последовательностям ДНК [9]. Аналогичная ZFN технология TALEN (Transcription activator-like effector nucleases), функционирующая за счет белков TALE и эндонуклеаз рестрикции, была разработана в 2009 г. [10, 11]. Несмотря на широкое применение в экспериментах *in vitro* и на модельных животных, вышеперечисленные методы являются дорогостоящими и затратными по иным ресурсам, требуют применения сложных технологий белковой инженерии [12]. В совокупности с наличием нецелевых эффектов (разрезов в нуклеиновых кислотах) эти недостатки являются препятствием для эффективного внедрения в клиническую практику [13, 14]. В 2013 г. была разработана система геномного редактирования CRISPR/Cas9, которая представляет собой химерную молекулу, состоящую из сайт-специфичной гидовой РНК (гРНК) и белка Cas9, обладающего нуклеазной активностью, что позволяет точно вырезать определенные участки ДНК и, при необходимости, заменять их донорной ДНК (участок ДНК, содержащий последовательность, которой необходимо заменить удаленный набор нуклеотидов) [15]. Количество исследований с использованием данной технологии, начиная с 2013 г., ежегодно растет двукратно (рис. 1). CRISPR/Cas9 представляет большой интерес для научного сообщества в связи с относительной простотой применения и, по мнению исследователей, адекватной ресурсозатратностью [16].

Редактирование процессов транскрипции и трансляции заключается в возможности воздействовать на данные процессы с целью замены синтеза мутантного белка на нормальный. Существует два основных метода, с помощью которых возможно модифицировать процесс экспрессии гена: экзон-скиппинг — метод пропуска экзонов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и сплайсосома-опосредованный

транс-сплайсинг (COT) — процесс сплайсинга между двумя молекулами пре-мРНК, целью которого является синтез мРНК с набором нормальных экзонов [17]. В целом ряде исследований данные методы уже доказали свою эффективность. COT и экзон-скиппинг, разрабатываемые и применяемые в лечебных целях, можно обозначить как терапевтическое редактирование РНК.

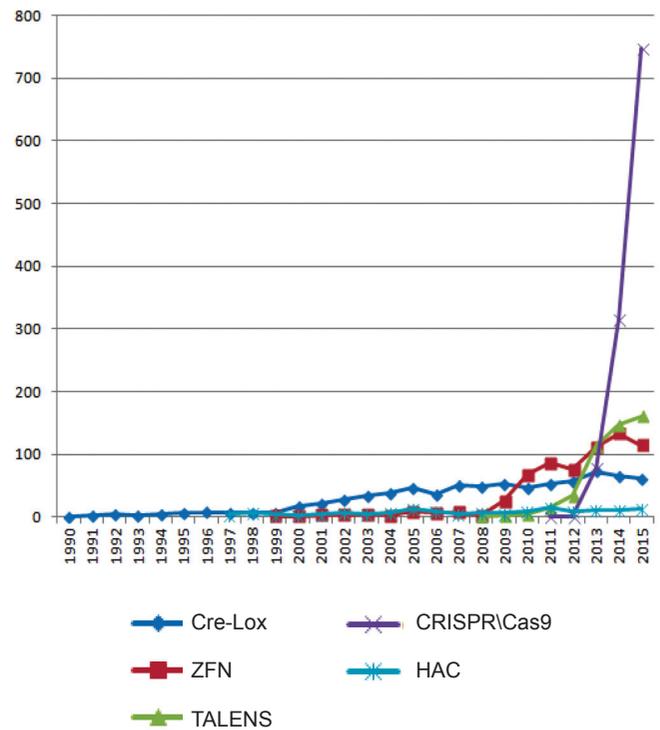


Рис. 1. Количество публикаций по основным технологиям геномного редактирования (включая Human artificial chromosome, HAC), по данным <http://pubmed.com>

Все методы генной терапии требуют определенной доставки терапевтических молекул непосредственно в целевую клетку. Невирусный генный трансфер, в основном, осуществляется с помощью внесения в целевые клетки плазмидного вектора, несущего геннотерапевтическую (трансгенную) информацию. Достоинствами плазмид являются неограниченный размер гена, а также отсутствие иммуногенности. Тем не менее, эффективность трансфекции при прямом введении в ткани составляет около 1% [18, 19], а экспрессия гена продолжается лишь некоторое время, что в случае коррекции наследственного заболевания требует повторного (или многократного) введения [20]. Вместе с тем, в некоторых исследованиях местное использование плазмидных векторов приводило к увеличению синтеза дистрофина на 10% у mdx (дистрофин-дефицитных) мышей [21] и восстановлению экспрессии дистрофина (6% — полное, 26% — частичное) у пациентов с МДД. Дистрофин-позитивные мышечные волокна были обнаружены через 24 нед. после введения вектора [22].

В большинстве исследований вирусный генный трансфер осуществляется с помощью рекомбинантных векторов на основе лентивируса, аденовируса, ААВ, вируса простого герпеса (ВПГ-1) и HAD вектора (Helper-dependent adenoviral vector). Наиболее

емкими являются ВПГ-1 вектор (до 100 тыс. п. н. трансгенной информации), область применения которого ограничена тропностью вируса к нервной ткани, и HAD вектор (до 37 тыс. п. н. трансгенной информации), более безопасный и стойкий в отношении длительности трансгенной экспрессии, чем аденовирус [23]. Широкое применение в генной терапии нашел AAV вектор, что связано с крайне низкой иммуногенностью, отсутствием онкогенности и длительностью экспрессии трансгена (больше года). Несмотря на небольшую емкость AAV, являющуюся основным недостатком вектора, существуют способы обойти данное ограничение за счет двойной трансфекции участков гена, конкатамеризации, гомологичной рекомбинации [24], а также интеин-опосредованного транс-сплайсинга.

Экзон-скиппинг

Метод экзон-скиппинга (ЭС) заключается в обеспечении возможности «обойти» мутантный экзон в процессе сплайсинга и восстановить рамку считывания. Таким образом, из зрелой мРНК, и, как следствие, из белка, данная мутация будет исключена [25]. При этом, в связи с пропуском экзона, сам белок получается укороченным, поэтому данная технология будет эффективна только в том случае, когда укорочение молекулы белка не оказывает значительного влияния на его функциональность [26].

Механизм экзон-скиппинга заключается в связывании антисмысловых олигонуклеотидов (АОН), малых синтетических молекул РНК, с определенными участками целевой пре-мРНК, что и позволяет исключить из процесса сплайсинга определенные участки РНК [27].

АОН, запрограммированные на блокировку сайленсеров сплайсинга, коротких участков (4–18 нуклеотидов) ингибирующих сплайсинг пре-мРНК [28], также могут включить экзон в процесс сплайсинга, если он пропускается в результате мутантного экзон-скиппинга [29]. Кроме этого, они позволяют исключить считывание псевдо- и нонсенс-экзонов, включенных в ген в результате мутации [30].

Данные молекулы редко используются как самостоятельные РНК или ДНК олигонуклеотиды, в связи с тем, что они подвержены воздействию эндонуклеаз как вне клетки, так и при попадании в ядро клетки. Чтобы избежать этого, а также, для улучшения стабильности, проникновения через клеточную мембрану и накопления в ядре создаются специальные химические аналоги нуклеотидов, в состав которых входят различные компоненты, например, 2'-О-метил фосфоротиоат [31, 32]. В таком составе молекулы можно вводить напрямую в необходимую область (например, в конкретную мышцу при терапии наследственной мышечной патологии). Помимо этого используются AAV с малыми ядерными РНК, кодирующими антисмысловую последовательность [33]. Для экзон-скиппинга также применяют морфолиновые олигонуклеотиды (phosphorodiamidate morpholino nucleotides, PMO), которые нашли относительно широкое применение в разработке препаратов для экзон-скиппинга при миодистрофии Дюшенна, например, конструкция Eteplirsen (AVI-4658, Sarepta Therapeutics, США). Определенный интерес представляют соединения пептидов и PMO (Pip-PMO), которые доказали свою эффективность в ряде исследований [34, 35, 36], а также, как са-

мостоятельная группа АОН, трицикло-ДНК (ТрцДНК), молекулы, состоящие из 11–15 п. н. с дополнительными атомами углерода между C(5') и C(3') [37]. ТрцДНК также считаются одними из перспективных типов АОН и являются кандидатами для дальнейших клинических исследований [38, 39].

Описано применение экзон-скиппинга для создания метода терапии спинальной мышечной атрофии (СМА). В настоящее время первую фазу клинических исследований проходит кандидат в препараты IONIS-SMNRx, созданный для пропуска участка 7 экзона у пациентов с СМА 2 типа [40]. При атаксии телеангиоэктазии эффективность экзон-скиппинга в лимфоцитах пациентов зависела от концентрации АОН и составила 50–95%. Однако, в ходе экспериментов был обнаружен цитотоксический эффект из-за высоких концентраций, который проявился в снижении жизнеспособных клеток до 68% [41]. Исследования *ex vivo* на фибробластах пациентов при нейрофиброматозе 1 и 2 типов показали эффективность экзон-скиппинга для восстановления сплайсинга в мутантных генах *NF1* и *NF2*. В зависимости от типа мутации функциональность белка *NF1* была восстановлена на 87–100% [42]. При нейрофиброматозе 2 типа описано восстановление функциональности белка мерлин и снижение пролиферации фибробластов на 41% через 24 ч. и на 67% через 48 ч. [43]. В исследованиях *ex vivo* на фибробластах пациентов при врожденном нарушении гликолизирования экзон-скиппинг привел к 100% восстановлению нормальной мРНК и повышению уровня экспрессии белка PPM2 от 9% до 23% [44]. Для терапии болезни Ниманна – Пика С типа исследователи предложили исключить приводивший к дисфункции псевдоэкзон и восстановили нормальный сплайсинг на модели клеток HeLa и фибробластов пациентов, трансфицированных мини-геном с мутацией [45]. В случае мегалэнцефалической лейкоэнцефалопатии с субкортикальными кистами 1 типа проведено исключение псевдоэкзона и восстановление нормального сплайсинга *ex vivo* в лимфоцитах пациентов [46], а при моделировании генетического дефекта болезни Пелицеуса – Мерцбахера с использованием мутантного мини-гена, трансфицированного в клетки ОРС, отмечено восстановление нормального сплайсинга мРНК на 54% [47, 48]. В исследованиях по лечению таупатий был осуществлен успешный скиппинг 10 экзона гена *MAPT* на культуре клеток HEK293FT [49].

Разрабатываются геннотерапевтические подходы к лечению оссифицирующей прогрессирующей фибродисплазии (ОПФ), при которой даже минимальная травма мышечной ткани (например, прививка) приводит к ее локальному замещению костными образованиями. Научной группой из университета Лейдена был осуществлен пропуск экзона в гене *ALK2* у мышей, который обычно подвержен мутации. Инактивация рецептора *ALK2* позволила значительно снизить трансдифференцировку миобластов в остеобласты в остеогенной среде *in vitro*, что позволяет сделать вывод о потенциальной перспективности экзон-скиппинга в терапии ОПФ [50].

Наиболее широко данная технология применяется в разработке препаратов для лечения МДД. Дистрофин, мутации в котором ответственны за развитие МДД, сохраняет свою функциональность, если N- и C-концевые домены способны образовывать

связь цитоскелета и внеклеточного матрикса [51]. Таким образом, восстановление рамки считывания посредством удаления внутренних экзонов позволяет получить хоть и усеченный, но функциональный белок. Так как большинство мутаций в гене дистрофина происходит на ограниченных участках (например, с 45 по 53 и с 2 по 20 экзоны более чем у 50% пациентов) [52], экзон-скиппинг является оптимальным методом коррекции МДД. Исследования конструкции Eteplirsen созданной на основе РМО для пропуска экзона 51 в гене дистрофина, достигли 3 фазы клинических исследований. Еще одно вещество для экзон-скиппинга на основе 20ме – Drisapersen (Kyndrysa), разработка компании BioMarin (США), было отклонено управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA) по причине недостаточной эффективности (уровень дистрофина по данным вестерн-блоттинга после лечения был примерно равен уровню до лечения – около 0,3% от нормального уровня) [53].

Транс-сплайсинг

Существует три основных варианта транс-сплайсинга РНК: эндонуклеазный, рибозимопосредованный, сплайсосомо-опосредованный

транс-сплайсинг, а также один белковый тип: интеин-опосредованный транс-сплайсинг.

Рибозим-опосредованный транс-сплайсинг

Транс-сплайсинговые рибозимы включают в себя гидовую последовательность, которая комплементарна участку целевой мРНК, рибозимный домен, а также 3' участок экзона, который будет транс-сплайсирован. Данное соединение катализирует разрезание участка целевой мРНК и лигирование связанного с рибозимой 3' экзона [54] (рис. 2).

Ряд исследований *in vitro* показал эффективность данного типа транс-сплайсинга в коррекции генетических дефектов, вызывающих серповидноклеточную анемию, рак яичников, рак поджелудочной железы [55].

Считается, что в рибозимопосредованном транс-сплайсинге, остается ряд технологических недостатков, а именно: возможна только замена 3' экзона, данная реакция обратима, большинство целевых последовательностей недоступны для рибозимов, в связи со сложной структурной организацией и взаимодействием с большим количеством белков *in vivo*, а эффективности рибозимного транс-сплайсинга недостаточно для восстановления функции белка в моделях на животных [54].

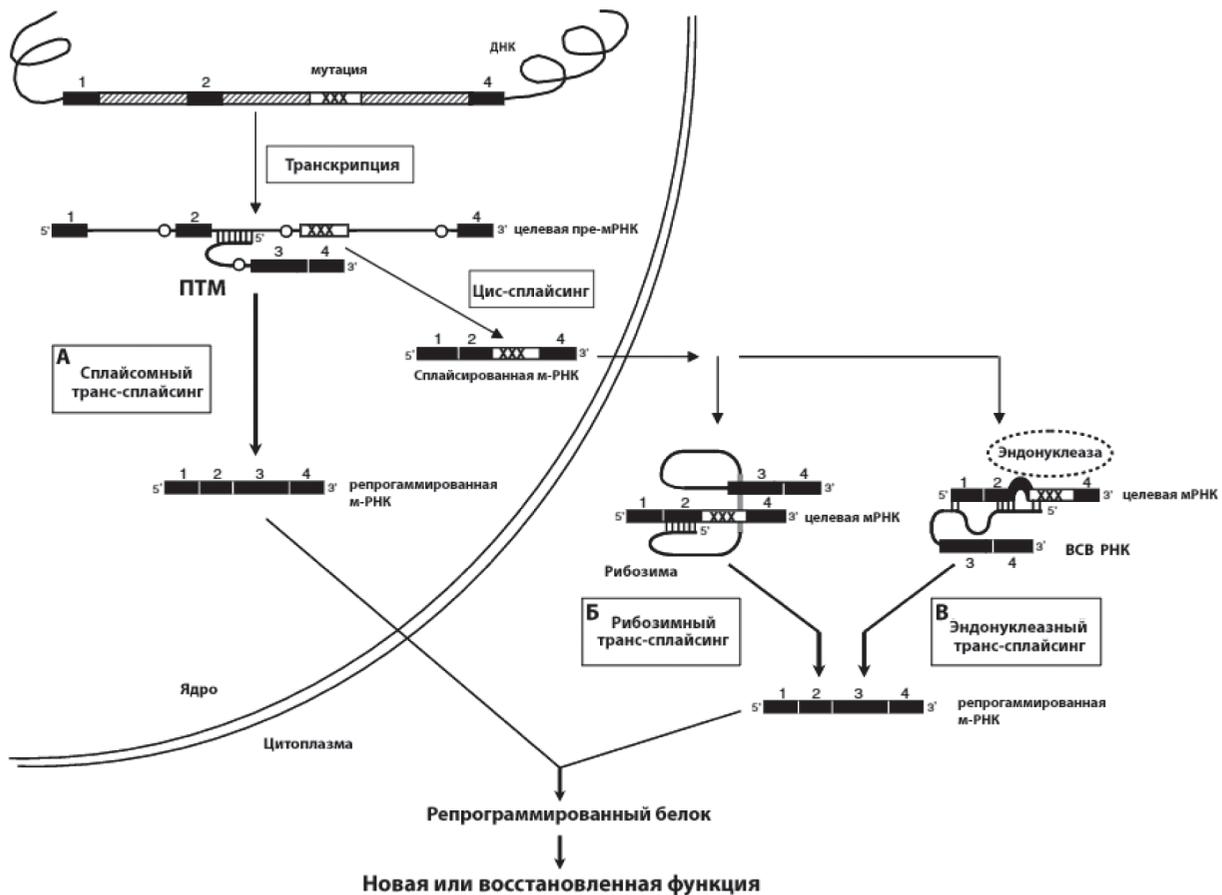


Рис. 2. Три реакции транс-сплайсинга РНК:
 А – сплайсосомо-опосредованный транс-сплайсинг (интроны представлены линиями, экзоны – прямоугольниками, точки ветвления – кругами);
 Б – рибозимный транс-сплайсинг;
 В – эндонуклеазный транс-сплайсинг (VCB РНК – выступ-спираль-выступ РНК).
 По [54] с изм.

Эндонуклеазный и интеин-опосредованный белковый транс-сплайсинг

Эндонуклеазный и интеин-опосредованный транс-сплайсинг — наименее используемые виды транс-сплайсинга, описанные лишь в единичных исследованиях. Как и при рибозим-опосредованном транс-сплайсинге редактирование РНК происходит в цитоплазме клетки.

При эндонуклеазном транс-сплайсинге целевая мРНК и комплементарная связывающаяся последовательность формируют структуру выступ-спираль-выступ, которая распознается и разрезается эндонуклеазой. Далее, участки мРНК объединяются эндогенной лигазой (рис. 2).

Помимо РНК, белки также могут быть объектом для транс-сплайсинга. Интеин-опосредованный транс-сплайсинг осуществляется с помощью интеинов — белковых молекул, которые способны объединить два белка-предшественника в единую химерную молекулу (рис. 3).

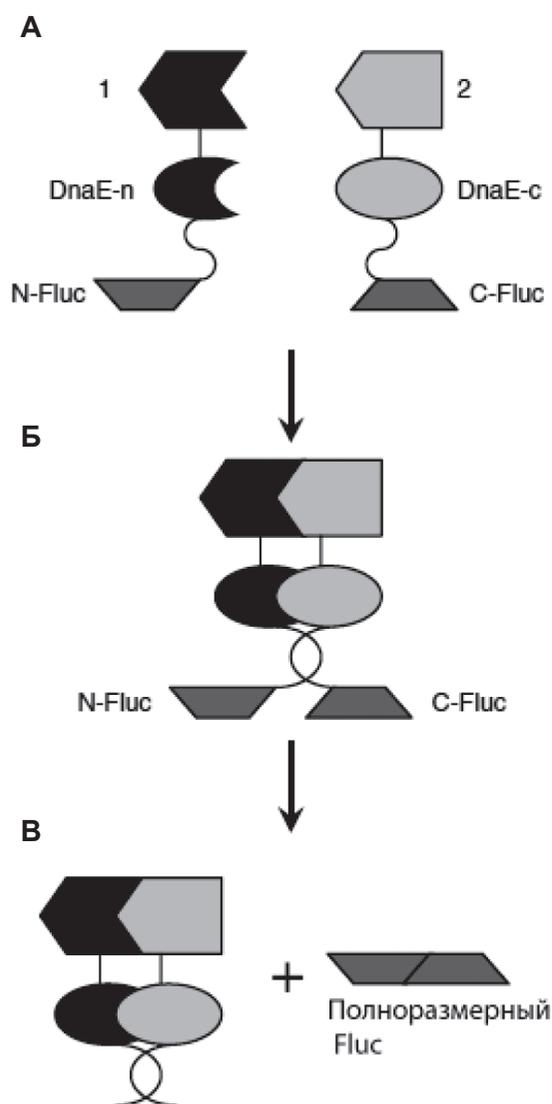


Рис. 3. Интеин-опосредованный белковый транс-сплайсинг (на примере люциферазы светлячка, Fluc):
 А — белок 1 связан с N-концом половины интеина (DnaE-n) и N-концом Fluc (Белок 2 связан с C-концом половины DnaE (DnaE-c) и оставшимся C-участком Fluc);
 Б — взаимодействие белков 1 и 2 стимулирует транс-сплайсинг между N и C половинами DnaE;
 В — объединение двух фрагментов люциферазы.
 По [54] с изм.

Этот метод нашел применение в восстановлении молекул белка, кодирующий объем которых превосходит емкость векторов, используемых для доставки генетических конструкций, например, дистрофина. Также, были разработаны методы объединения частей белка Cas9, который является элементом системы коррекции генома CRISPR/Cas9. Генетические конструкции, несущие информацию о его частях, были трансфицированы отдельно посредством рААВ, а затем объединены с помощью интеин-опосредованного белкового транс-сплайсинга. Данный метод позволил обойти ограничение объема рААВ [56].

Сплайсосомо-опосредованный транс-сплайсинг

В процессе, катализируемом сплайсосомой, ферментным комплексом из множества белков и 4 типов рибонуклеопротеинов [57], из пре-мРНК удаляются интроны, в результате чего формируется «зрелая» молекула мРНК. Если данная реакция идет на одной молекуле пре-мРНК, то происходит цис-сплайсинг, в случае, если процесс сплайсинга переходит с одной молекулы пре-мРНК на другую и формируется мРНК с новым составом экзонов, то данный процесс называется сплайсосомо-опосредованным транс-сплайсингом, который крайне редко встречается в эукариотических клетках [58]. В клетках человека естественный транс-сплайсинг был обнаружен между копиями гена рецептора эстрогена, между различными транскриптами цитохромоксидазы, закодированными на противоположных цепях, а также между эндогенными мРНК клеток и генами аденовирусов с высоким уровнем экспрессии [59].

Индукция искусственного сплайсосомо-опосредованного транс-сплайсинга позволяет произвести корректировку мутаций на уровне пре-мРНК и процесса транскрипции, и соответственно, восстановить экспрессию нормального белка (см. рис. 2).

Для осуществления процесса СОТ необходимо существование трех различных компонентов: сплайсосома, целевая пре-мРНК и олигонуклеотидная пре-транс-сплайсинговая молекула (ПТМ) (или искусственная транс-сплайсинговая молекула — ИТМ [60]). Чтобы инициировать транс-сплайсинг в клетку вносятся созданные в лабораторных условиях ПТМ, дизайн которых зависит от поставленных целей: в частности, от типа реакции транс-сплайсинга и белка, который необходимо восстановить. Основными структурными элементами ПТМ являются: связывающий домен — участок, комплементарный интрону (за которым следует заменяемая последовательность; служит для осуществления связи с целевой молекулой пре-мРНК); домен сплайсинга, который служит для инициирования реакции СОТ; кодирующий домен — последовательность, которая будет внедрена в зрелую мРНК [54] (рис. 4).

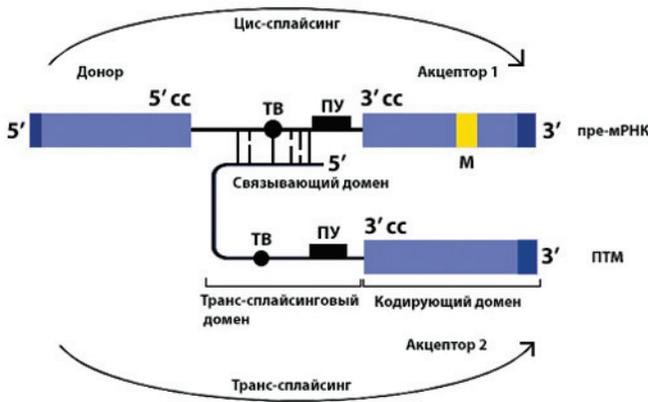


Рис. 4. Принципиальная схема претрансплайсинговой молекулы: СС – сайт сплайсинга; ТВ – точка ветвления; ПУ – пиримидиновый участок; М – мутация

СОТ может протекать по трем основным направлениям и зависит от структуры ПТМ (рис. 5): 3' транс-сплайсинг, 5' транс-сплайсинг и замена внутреннего экзона. 3' транс-сплайсинг является наиболее изученным и активно используемым в лабораториях видом транс-сплайсинга [61, 62], когда образуется связь 3' сайта сплайсинга молекулы ПТМ с 5' сайтом мишени (целевой пре-мРНК). В своей структуре ПТМ должна иметь сайт полиаденилирования (полиА), но не несет АТG-иницирующий кодон, который будет получен от пре-мРНК-мишени.

5' транс-сплайсинг, осуществляется в результате соединения 3' сайта мишени и 5' сайта сплайсинга молекулы ПТМ, несущей иницирующий кодон, но с отсутствием сигнала полиаденилирования. Данный тип СОТ не так широко изучен [63].

Внутренняя замена экзона, или двойной транс-сплайсинг, происходит с участием двойной ПТМ, имеющей как 3', так и 5' сайты сплайсинга, а также 2 связывающих домена. Данные ПТМ не содержат иницирующих старт-кодонов или сигналов полиаденилирования, поэтому их довольно небольшой размер (зависящий, однако, от длины последовательности, которая будет транс-сплайсирована), а также возможность заменить только необходимые экзоны, является преимуществом данного типа СОТ и позволяет трансфицировать небольшие объемы генетической информации.

В эффективности СОТ учитывается не только структура ПТМ (длина и доступность связывающего домена, сила участков сплайсинга и точки ветвления) [60, 64], но и ее концентрация, вектор доставки, а также концентрация целевых пре-мРНК.

СОТ доказал свою способность корректировать мутантные белки при различных заболеваниях. Например, при миотонической дистрофии 1 типа: плазмиды, кодирующие ПТМ были трансфицированы в культуры клеток CCL-136, содержащих мини-ген *DMPK* (15, 16 экзоны), уровень транс-сплайсинга составил 0,02–7,41%, данный разброс связан с различным дизайном ПТМ [60].

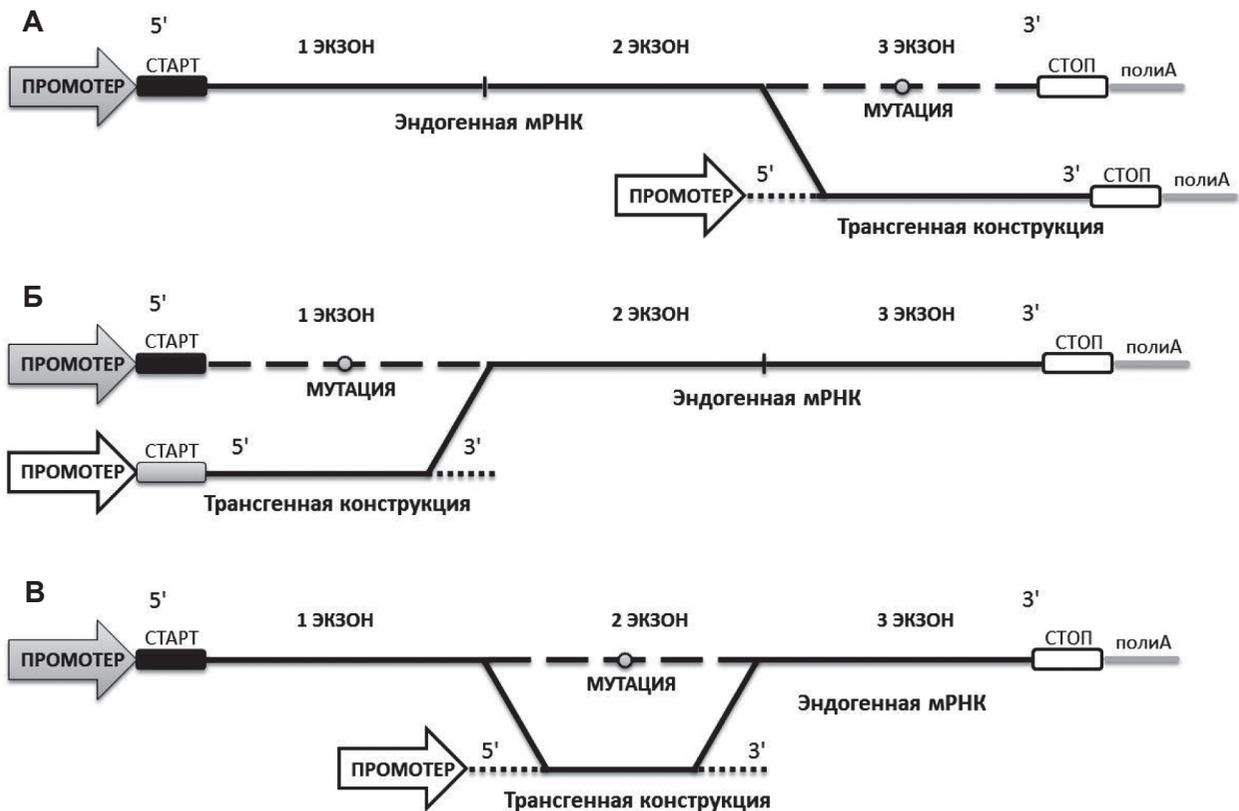


Рис. 5. Основные направления сплайсосо-опосредованного транс-сплайсинга: А – 3' транс-сплайсинг; Б – 5' транс-сплайсинг; В – замена внутреннего экзона (пунктирной линией отмечен экзон эндогенной мРНК, который содержит мутацию; трансгенная конструкция (ПТМ) содержит сайты узнавания и сплайсинга (отмечены точками))

При муковисцидозе: эпителиальные клетки дыхательных путей были трансфицированы рААВ-ПТМ, уровень экспрессии муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (белок МВТР) составлял 13,6–14,2% в сравнении с контрольной группой [65]. При гемофилии А произведено восстановление синтеза фактора 8 у нокаутных мышей посредством введения плазмид, кодирующих ПТМ в порталную вену. Активность фактора 8 сохранялась в течении 7 дней с пиком на 49–78 ч. после введения [66]. При простом буллезном эпидермолизе транс-сплайсинг экзонов 1–7 гена *K14* позволил восстановить нормальную мРНК до уровня 15,5% от исходного [67]. При спинальной мышечной атрофии в мышиную модель, экспрессирующую две геномные копии *SMN2* человека, были трансфицированы рААВ-ПТМ, что привело к увеличению продолжительности жизни на 3 дня [68, 69]. Также была показана возможность создавать терапевтические белки *in vivo* на примере модификации аполипопротеинов с помощью транс-сплайсинга [70] и высокая эффективность транс-сплайсинга в экспериментах на моделях онкозаболеваний (80% транс-сплайсированных РНК относительно общего количества РНК в работе по транс-сплайсингу участка E6–E7 ВПЧ в плаزمиде, введенных в клетки нейробластомы у мышей) [71].

Эффективность СОТ также зависит и от специфичности ПТМ, которая заключается в точности связывающей последовательности. Необходимо, чтобы связывающий домен был строго комплементарен интрону, за которым будет идти процесс транс-сплайсинга. Наиболее оптимальным был показан размер связывающего домена в 70–150 п.н. [72].

Сплайсосомо-опосредованный транс-сплайсинг имеет значительные преимущества по сравнению с другими методами генной терапии: это возможность заменить только те участки генетических структур, в которых произошла мутация, что позволяет уменьшить объем терапевтической конструкции и использовать удобные и безопасные в применении векторы, объем которых ограничен. Также, важным является то, что СОТ происходит только в тех клетках, где находится целевая пре-мРНК, таким образом, воздействие вектора с ПТМ является более точным, а уровень синтезируемого белка остается на прежнем уровне и будет зависеть от механизмов внутренней регуляции, что, в свою очередь, позволит избежать эктопической или сверхэкспрессии, а также получить полноценный (не усеченный, как при экзон-скиппинге) белок. Метод СОТ позволяет исправлять доминантно-негативные мутации и имеет аллелеспецифичность.

СОТ нашел применение в молекулярной визуализации процесса экспрессии генов, что было показано в ряде экспериментов. В частности, в клетках нейробластомы, введенных мышам и содержащих целевую плазмиду с 5' участком ренилла люциферазы и участком E6–E7 ВПЧ, который обнаруживается практически во всех клетках рака шейки матки, был проведен транс-сплайсинг, в результате которого был добавлен 3' участок ренилла люциферазы и создана полноценная последовательность гена люциферазы. Активность люциферазы позволила выявить опухолевые клетки в организме мышей. Данный эксперимент показал, что СОТ имеет также и диагностический потенциал, а в качестве маркера могут быть использованы другие белки-репортеры. Этот метод также позволяет определить эффективность ПТМ и выявить наиболее оптимальный дизайн [73].

Мышечные дистрофии

Мышечные дистрофии (МД) — группа наследственных заболеваний мышечной ткани, с постепенно развивающейся дегенерацией мышц и как следствие снижением их объема и угасанием функции. Они относятся к миопатиям — сборной когорте болезней, характеризующейся первичным поражением скелетных мышц, в основе патоморфогенеза которых лежит цепь «ген-белок-функция-болезнь» [74]. Различные мутации в генах, кодирующих мышечные белки (миссенс-мутации, нонсенс-мутации, триплетные повторы и др.) приводят к изменению структуры гена (замене последовательности нуклеотидов, преждевременной остановке рамки считывания), и, соответственно, изменению функции белка вплоть до ее полного прекращения. Форма МД зависит не только от мутаций в генах в целом, но и от мутаций в конкретных экзонах, что и объясняет полиморфизм данной группы заболеваний. Основными белками, мутации в которых становятся причиной миодистрофий являются: дистрофин, дисферлин, интегрин $\alpha 7$ и $\alpha 9$, кавеолин 3, кальпаин 3, коллаген VI типа, ламины A/C, мерозин, саркогликан, селенопротеин N1, эмерин, холинкиназа β .

Наиболее часто патологические изменения затрагивают дистрофин, что является причиной развития таких заболеваний как миодистрофия Дюшенна (МДД), болеют в среднем 1:3500 мальчиков, и миодистрофия Беккера (МДБ), распространенность которой 1:30000. МДД проявляется прогрессирующей дистрофией проксимальных мышц, псевдогипертрофией голени, снижением функциональности дыхательных мышц и миокарда, в 30% случаев возможна задержка умственного развития, дебют заболевания приходится, как правило на возраст 2–5 лет. Клинические проявления МДБ аналогичны миодистрофии Дюшенна, но менее ярко выражены, дебют заболевания — около 20 лет. Поиск способов коррекции мутаций в гене дистрофина является одной из наиболее актуальных глобальных задач генной терапии на планете [75], что связано с высокой распространенностью, отсутствием этиотропного лечения, а также инвалидизацией и гибелью больных в трудоспособном возрасте. Основным подходом к терапии данной патологии остается экзон-скиппинг.

Менее распространенными, но также социально значимыми являются дисферлинопатии. Их общая распространенность составляет 0,5–1:200000 новорожденных [76]. Дисферлинопатиями называется группа нейромышечных заболеваний, наследуемых по аутосомно-рецессивному типу, развитие которых обусловлено мутацией в гене дисферлина, в результате чего формируется неполноценный и нефункциональный белок [77]. Дисферлин — это трансмембранный белок (230 кДа), состоящий из 2080 аминокислот. В состав макромолекулы входят следующие участки: семь C2 доменов, которые обладают способностью связывать фосфолипиды и белки Ca^{2+} -зависимым способом, играют роль в формировании функциональных димеров белка; два DysF домена, чья функция до конца не известна; один мембран-связывающий C-концевой домен [78]. Дисферлин локализуется в цитоплазматической мембране, а также в мембране эндоплазматического ретикулума. Уровень синтеза дисферлина наиболее высок в поперечно-полосатой мускулатуре, в меньшем количестве в других структурах, например

в моноцитах, синцитиотрофобласте плаценты, эндотелии, головном мозге, поджелудочной железе и почках [79, 80]. В отсутствие дисферлина мышечные волокна подвергаются некрозу, из-за снижения уровня репарации мембран [81, 82].

Существует два направления в терапии дисферлинопатий: 1) патогенетическая и симптоматическая терапия, которые наиболее широко изучены и используются в клинической практике и 2) этиотропная. Патогенетическая терапия подразумевает воздействие на 4 основных звена патогенеза: некроз мышечных волокон, воспаление, регенерация мышечных волокон и псевдогипертрофия мышечных волокон, фиброз и атрофия мышечного органа [83]. Этиотропная терапия заключается в генетической коррекции мутации в гене *DYSF*, с целью избежать первичного поражения мышечного волокна в связи с отсутствием или неполноценностью дисферлина.

Опыты с различными видами клеток, применяемыми в клеточной терапии (гемопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, миобласты, интерстициальные стволовые клетки мышц, индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК)) не показали себя эффективными как самостоятельные терапевтические агенты [42], тем не менее, некоторые из них представляют определенный интерес для исследователей в комбинации с генными препаратами (генно-клеточная терапия). Например, аллогенная трансплантация генетически модифицированных клеток [84], которые обладают способностью мигрировать к очагам воспаления. Такой метод также позволяет избежать вирусной нагрузки при использовании ряда векторов в генной терапии, которая наряду с генно-клеточной относится к этиотропным методам лечения. Очевидно, наиболее перспективным является именно данное направление, так как оно позволит полностью или частично восстановить дисферлин и, соответственно, в той или иной степени смягчить проявления заболевания, либо, в идеальном случае, добиться полной ремиссии заболевания.

Опыт редактирования РНК для коррекции миодистрофий

Большой интерес представляют методики терапевтического редактирования РНК: экзон-скиппинг и транс-сплайсинг. Для их применения нет необходимости использовать несколько векторов с разными генетическими конструкциями для ко-трансфекции, достаточно одного безопасного рААВ вектора, технология получения и использования которого отработана во множестве исследований. А для экзон-скиппинга создан целый ряд химических конструкций, которые применялись в опытах по коррекции дистрофина.

Экзон-скиппинг показал свою эффективность в опытах по разработке генно-терапевтических препаратов для мышечных дистрофий, что позволяет рассматривать этот метод как один из основных подходов в лечении дисферлинопатий. Данная технология была применена в коррекции мутации в экзоне 32. В миотубы (которые были получены из фибробластов пациента, трансфицированных лентивирусом, несущим кодирующую MuoD информацию) были введены АОН, в результате чего был получен функциональный дисферлин. Гистоморфометрический анализ мышц показал увеличение числа волокон

с центрально расположенными ядрами через месяц после введения АОН [85]. Научной группой из Канады ведется разработка технологии экзон-скиппинга в 21 и 28 экзонах, моделирование *in silico* позволило установить возможность осуществления данного метода. Группа ученых из Франции осуществила скиппинг 32 экзона на мышцах и изучает возможность восстановления фенотипа мышечной ткани с помощью этой методики [86].

Технология сплайсосо-опосредованного транс-сплайсинга обладает определенными преимуществами перед экзон-скиппингом, так как COT позволяет полностью заменить мутантный экзон на нормальный, а не исключать из РНК генетические последовательности. Техника проведения COT, как и экзон-скиппинг, отработана во множестве исследований, что облегчает ее применение для терапии дисферлинопатий. Первый опыт применения COT для коррекции мутации в гене *DYSF* был продемонстрирован в 2014 г. во Франции. Для эксперимента *in vitro* использовали культуру клеток HER911 (human embryonic retinoblasts) с мини-геном дисферлина (экзоны 51–55), которую трансфицировали рААВ, содержащим кодирующую ПТМ информацию. Вестрн-блот анализ показал наличие соответствующих мини-белков во всех образцах. Далее авторы предприняли попытку произвести транс-сплайсинг *in vivo* у 1-месячных мышей. рААВ-ПТМ были инъецированы в большеберцовую мышцу. Однако, проведенный через месяц иммуногистохимический анализ не выявил присутствия необходимых белков в мышечной ткани. При этом были обнаружены побочные продукты в виде неидентифицированных белков, что позволило предположить способность ПТМ самостоятельно подвергаться цис-сплайсингу [87]. В 2015 г. другая научная группа из Франции осуществила замену экзонов (31–55, 32–55, 36–55, 37–55) с помощью 3' COT на миобластах от пациентов с ПКМД2Б, а также на мышцах. ПЦР и реакция иммунопреципитации продемонстрировали наличие полноразмерных и функциональных транскриптов дисферлина как *in vitro*, так и *in vivo* [88]. Эти эксперименты показали, что COT имеет хороший потенциал для коррекции дисферлинопатий, и необходима дальнейшая тонкая отработка этой технологии.

Помимо терапевтического редактирования РНК рассматриваются и другие лечебные подходы. Был разработан и испытан на мышцах рекомбинантный аденовирус, несущий кодированный ген *DYSF* и продемонстрирован синтез полноценного дисферлина в организме животных [89]. Чтобы смягчить течение дисферлинопатий были созданы и успешно протестированы на мышцах методики по внедрению мини-гена дисферлина, содержащего только два из семи C2 домена, был получен биологически активный, частично функциональный, дисферлин [90]. На мышечных моделях, показали свою эффективность методы внесения полного гена дисферлина за счет перекрывающихся генетических конструкций посредством рААВ вектора [91] и с помощью транспозона «Спящая Красавица», который способен интегрировать генетические последовательности объемом более 10 тыс. п. н. в целевой геном [92]. Также данный метод рассматривается как способ коррекции генома мезоангиобластов *ex vivo*, в том числе, полученных из ИПК, для дальнейшего введения в организм пациента. Применение системы геномного редактирования CRISPR/Cas9

уже было опробовано на mdx-мышцах и показало хорошие результаты в восстановлении дистрофина [93], поэтому необходима отработка данного метода и на клетках с мутацией в гене *DYSF*. Эта технология позволяет, как исключить вставочные мутации, так и заменить необходимый участок для восстановления функциональности белка.

Таким образом, транс-сплайсинг и экзон-скиппинг, с использованием рААВ и новых химических средств доставки или АОН соответственно, и учитывающая накопленный опыт лабораторных и клинических исследований, следует рассматривать как наиболее оптимальные подходы в терапии миодистрофий, в частности ПКМД. Заслуживает внимания и техно-

логия CRISPR/Cas9, но вопрос ее применимости в лечении, как наследственной мышечной патологии, так и других генетических заболеваний, остается на начальных стадиях разрешения.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00657. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

ЛИТЕРАТУРА:

- Aoki M. Dysferlinopathy. In: Pagon R.A., Adam M.P., Ardinger H.H. et al., editors. Gene Reviews. Seattle (WA): University of Washington; 2015.
- DMD Gene (Protein Coding) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DMD>.
- Reinhard W., Russell S.J., Curiel D. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 2007; 8: 573-87.
- Azakar B., Di Fulvio S. Modular dispensability of dysferlin C2 domains reveals rational design for mini-dysferlin molecules. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(33): 27629-36.
- Aartsma-Rus A., Singh K.H., Fokkema I.F. et al. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies? *Eur. J. Hum. Genet.* 2010; 18(8): 889-94.
- Wein N., Avril A., Bartoli M. et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 2010; 31(2): 136-42.
- Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1987; 7(6): 2087-96.
- Orban P.C., Chui D., Marth J.D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *PNAS USA* 1992; 89(15): 6861-5.
- Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B. et al. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *PNAS USA* 1998; 95(25): 14628-33.
- Moscou M.J., Bogdanov A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1501.
- Boch J., Scholze H., Schornack S. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1509-12.
- Perez-Pinera P., Kocak D.D., Vockley C.M. et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods* 2013; 10: 973.
- Cornu T., Thibodeau-Beganny S., Guhl E. et al. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases molecular therapy. *Mol. Ther.* 2008; 16(2): 352-8.
- Owens J.B., Urschitz J., Stoytchev I. et al. Chimeric piggyBac transposases for genomic targeting in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 6978-91.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M. et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- Caplan A., Parent B., Shen M. et al. No time to waste — the ethical challenges created by CRISPR. *EMBO reports* 2015; 16: 1421-6.
- Koller U., Wally V., Baue J. et al. Considerations for a successful RNA trans-splicing repair of genetic disorders. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2014; 3(4): e157.
- Kósa M., Zádor E. Transfection efficiency along the regenerating soleus muscle of the rat. *Mol. Biotech.* 2013; 54(2): 220-7.
- Nishikawa M., Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12(8): 861-70.
- Herweijer H., Zhang G., Subbotin V.M. et al. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene Med.* 2001; 3(3): 280-91.
- Zhang G., Ludtke J.J., Thioudellet C. et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15(8): 770-82.
- Romero N.B., Braun S., Benveniste O. et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15(11): 1065-76.
- Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 157(2): 153-65.

24. Lostal W., Bartoli M., Bourg N. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(10): 1897-907.
25. Aartsma-Rus A., Fokkema I., Verschuuren J. et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* 2009; 30(3): 293-9.
26. Prakash V., Moore M., Yáñez-Muñoz R.J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol. Ther.* 2016; 24(3): 465-74.
27. Southwell A.L., Skotte N.H., Bennett C.F. et al. Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 2012; 18: 634-43.
28. Wang Z., Xiao X., Van Nostrand E. et al. General and specific functions of exonic splicing silencers in plicing control. *Molecular Cell.* 2006; 23(1): 61-70.
29. Siva K., Covello G., Denti M.A. Exon-skipping antisense oligonucleotides to correct missplicing in neurogenetic diseases nucleic acid therapeutics. 2014; 24(1): 70.
30. Dhir A., Buratti E. Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *FEBS J.* 2010; 277(4): 841-55.
31. Saleh A.F., Arzumanov A.A., Gait M.J. Overview of alternative oligonucleotide chemistries for exon skipping. In: Exon Skipping. Aartsma-Rus A., editor. *Methods Mol. Biol.* (2012), 365-78.
32. van Deutekom J.C., Bremmer-Bout M., Janson A.A. et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 1547-1554.
33. Lu Q.L., Yokota T., Takeda S. et al. The status of exon skipping as a therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy. *Therapy* 2011; 19(1): 9-15.
34. Betts C., Saleh A.F., Arzumanov A.A. et al. Pip6-PMO, a new generation of peptide-oligonucleotide conjugates with improved cardiac exon skipping activity for DMD treatment. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2012; 1(8): e38.
35. Yin H., Saleh A.F., Betts C. et al. Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice. *Mol. Ther.* 2011; 19(7): 1295-303.
36. Wu B., Lu P., Cloer C. et al., Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino. *Am. J. Pathol.* 2012; 181(2): 392-400.
37. Oligonucleotide based therapeutics. http://synthema.com/html/tricyclo-dna_platform.html.
38. Goyenvalle A., Griffith G., Babbs A. et al., Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 2015; 21(3): 454-62.
39. Järver P., O'Donovan L., Gait M.J. A chemical view of oligonucleotides for exon skipping and related drug applications. *Nucleic Acid Ther.* 2014; 24(1): 37-47.
40. Veltrop M., Aartsma-Rus A. Antisense-mediated exon skipping: Taking advantage of a trick from Mother Nature to treat rare genetic diseases. *Exp. Cell Res.* 2014; 325(1): 50-5.
41. Cavalieri S., Pozzi E., Gatti R.A. et al. Deep-intronic ATM mutation detected by genomic resequencing and corrected in vitro by antisense morpholino oligonucleotide (AMO). *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21(7): 774-8.
42. Pros E., Fernández-Rodríguez J., Canet B. et al. Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum. Mutat.* 2009; 30(3): 454-62.
43. Castellanos E., Rosas I., Solanes A. et al. In vitro antisense therapeutics for a deep intronic mutation causing Neurofibromatosis type 2. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21(7): 769-73.
44. Vega A.I., Pérez-Cerdá C., Desviat L.R. et al. Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene:

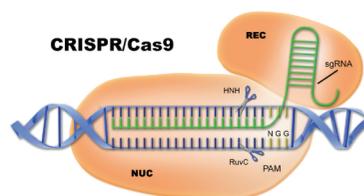
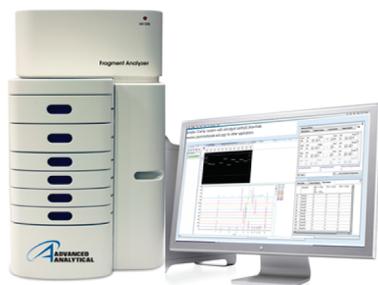
- toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Hum. Mutat.* 2009; 30(5): 795-803.
45. Rodríguez-Pascual L., Coll M.J., Vilageliu L. et al. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Hum. Mutat.* 2009; 30(11): e993-e1001.
46. Mancini C., Vaula G., Scalzitti L. et al. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts type 1 (MLC1) due to a homozygous deep intronic splicing mutation (c.895-226T>G) abrogated in vitro using an antisense morpholino oligonucleotide. *Neurogenetics* 2012; 13(3): 205-14.
47. Regis S., Corsolini F., Grossi S. et al. Restoration of the normal splicing pattern of the PLP1 gene by means of an antisense oligonucleotide directed against an exonic mutation. *PLoS One* 2013; 8(9): e73633.
48. Siva K., Covello G., Denti M.A. Exon-skipping antisense oligonucleotides to correct missplicing in neurogenetic diseases nucleic acid therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2014; 24(1): 69-86.
49. Peacey E., Rodriguez L., Liu Y. et al Targeting a pre-mRNA structure with bipartite antisense molecules modulates tau alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 9836-49.
50. Shi S., Cai J., de Gorter D.J. et al. Antisense-oligonucleotide mediated exon skipping in activin-receptor-like kinase 2: inhibiting the receptor that is overactive in fibrodysplasia ossificans progressive. *PLoS One* 2013; 8(7): e69096.
51. England S.B., Nicholson L.V., Johnson M.A. et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990; 343: 180-2.
52. Aartsma-Rus A., Van Ommen G-J.B. Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 2007; 13: 1609-24.
53. Peripheral and Central Nervous System Drugs Advisory Committee Meeting. November 24, 2015. Drisapersen FDA Briefing Document. November 24, 2015.
54. Mitchell L.G., McGarrity G.J. Gene therapy progress and prospects: reprogramming gene expression by trans-splicing. *Gene Therapy* 2005; 12: 1477-85.
55. Wally V., Muraier E.M., Bauer J.W. Spliceosome-mediated trans-splicing: the therapeutic cut and paste. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132: 1959-66.
56. Truong D.J., Kühner K., Kühn R. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(13): 6450-8.
57. Faustino N.A., Cooper T.A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003; 17: 419-37.
58. Finta C., Zaphiropoulos P.G. Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 5882-90.
59. Kikumori T., Cote G.J., Gagel R.F. Naturally occurring heterologous trans-splicing of adenovirus RNA with host cellular transcripts during infection. *FEBS Lett* 2002; 522: 41-6.
60. Chen H.Y., Kathirvel P., Yee W.C. et al. Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Therapy* 2009; 16: 211-7.
61. Yang Y., Walsh C.E. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Molecular Therapy* 2005; 12(6): 1006-12.
62. Puttaraju M., Jamison S.F., Mansfield S.G. et al. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17: 246-52.
63. Mansfield S.G., Clark R.H., Puttaraju M. et al. 5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *RNA* 2003; 9: 1290-7.
64. Mansfield S., Kole J., Puttaraju M. et al. Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Therapy* 2000; 7(22): 1885-95.
65. Liu X., Luo M., Zhang L.N. et al. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum. Gene Ther.* 2005; 16: 1116-23.
66. Chao H., Mansfield S.G., Bartel R.C. et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Med.* 2003; 9(8): 1015-9.
67. Wally V., Brunner M., Lettner T. et al. K14 mRNA reprogramming for dominant epidermolysis bullosa simplex. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 4715-25.
68. Coady T.H., Lorson C.L. Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.* 2010; 30: 126-30.
69. Shababi M., Glascock J., Lorson C.L. Combination of SMN trans-splicing and a neurotrophic factor increases the life span and body mass in a severe model of spinal muscular atrophy. *Hum. Gene Ther.* 2011; 22: 135-44.
70. Wang J., Mansfield S.G., Cote C.A. et al. Trans-splicing into highly abundant albumin transcripts for production of therapeutic proteins in vivo. *Mol. Ther.* 2009; 17(2): 343-51.
71. Patrick M., Puttaraju M., DiPasquale J. et al. Optimizing the efficacy of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for suicide gene therapy of cervical cancer molecular therapy. *Mol. Ther.* 2005; 11: S115.
72. Puttaraju M., DiPasquale J., Baker C.C. Messenger et al. RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol. Ther.* 2001; 4: 105-14.
73. Bhaumik S., Walls Z., Puttaraju M. et al. Molecular imaging of gene expression in living subjects by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *PNAS USA* 2004; 101: 8693-8.
74. Ривер Ф., Майер П., Вальтер-Леви У. И др. [River F., Meyer P., Walther-Louvie U. et al.] Врожденные мышечные дистрофии: классификация и диагностика. Нервно-мышечные болезни. 2014; 1: 6-19.
75. Prakash V., Moore M., Yáñez-Muño R.J., Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol. Ther.* 2016; 24(3): 465-74.
76. Volker S., De Waele L., Barresi R. Plasma Membrane Proteins: Dysferlin, Caveolin, PTRF/Cavin, Integrin $\alpha 7$, and Integrin $\alpha 9$. In: Goebel H.H., Sewry, C.A., Weller R.O., editors *Muscle disease: pathology and genetics*. 2nd ed. Basel: Neuropath Press 2013: 108-18.
77. Cai C., Weisleder N., Ko J.K. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(23): 15894-902.
78. de Morree A., Hensbergen P.J., van Haagen H.H. et al. Proteomic Analysis of the Dysferlin Protein Complex Unveils Its Importance for Sarcolemmal Maintenance and Integrity. *PLoS One* 2010; 5(11): e13854.
79. Anderson L.V., Davison K., Moss J.A. et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8(5): 855-61.
80. Bashir R., Britton S., Strachan T., et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* 1998; 20(1): 37-42.
81. Bansal D., Miyake K., Vogel S.S. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003; 423(6936): 168-72.
82. Старостина И. Г., Соловьева В. В., Юрьева К. С. и др. Дисферлинопатии: возможности диагностики, моделирования и генно-клеточной терапии. *Гены и клетки* 2013; 3(VIII): 61-71.
83. Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я. и др. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса. *Гены и Клетки* 2014; 4(IX): 6-33.
84. Meregalli M., Farini A., Torrente Y. Combining stem cells and exon skipping strategy to treat muscular dystrophy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008; 8(8): 1051-61.
85. Wein N., Avril A., Bartoli M. et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by anti-sense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 2010; 31: 136-42.
86. Bartoli M., Chapoton M., Mathieu Y. et al. Therapeutic exon skipping for LGMD2B. *Myology* 2016; 56.
87. Monjaret F., Bourg N., Suel L. et al. Cis-splicing and translation of the pre-trans-splicing molecule combine with efficiency in spliceosome mediated RNA trans-splicing molecular therapy. 2014; 6(22): 1176-87.
88. Philippi S., Lorain S., Beley C. et al. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24(14): 4049-60.
89. Старостина И.Г., Соловьева В.В., Шевченко К.Г. и др. Создание рекомбинантного аденовируса, кодирующего кодон-оптимизированный ген дисферлина, и анализ экспрессии рекомбинантного белка в культуре клеток in vitro. *Гены и клетки* 2012; 3: 25-8.
90. Allocca M., Doria M., Petrillo M. et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 1955-64.
91. Pryadkina M., Lostal W., Bourg N. et al. A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb dysferlin coding sequences. *Mol. Ther.* 2015; 2: 1-12.
92. Escobar H., Schöwel V., Spule S. et al. Full-length dysferlin transfer by the hyperactive sleeping beauty transposase restores dysferlin-deficient muscle. *Mol. Ther.* 2016; 5: 1-9.
93. Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 403-7.

Поступила: 15.03.2016



LIFE SCIENCE | НАУКА, МЕНЯЮЩАЯ МИР

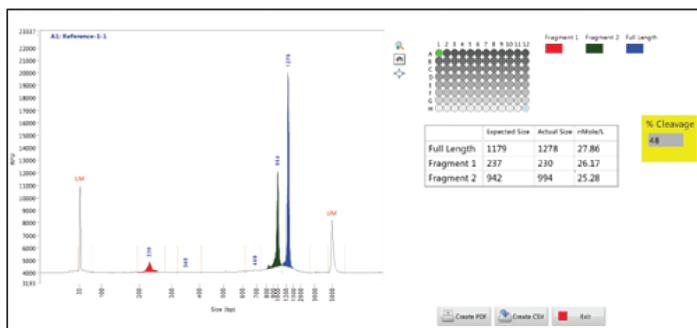
Fragment Analyzer - быстрое определение эффективности редактирования CRISPR/Cas9



Простой протокол:

1. Амплификация области интереса двух образцов – CRISPR отредактированного и образца дикого типа с последующим формированием гетеродуплексов
2. Разрезание гетеродуплексов в местах с неполным соответствием между нуклеотидами
3. Анализ фрагментов на Fragment Analyzer

Аналитическое программное обеспечение PROSize® в рамках системы Fragment Analyzer легко вычисляет размер фрагмента, его концентрацию и молярность, проводит диплоидный анализ, а также анализ частоты мутаций



Приведенные данные показывают ожидаемые и полученные длины фрагментов. Каждый фрагмент отмечен цветом для легкой идентификации. Процент расщепленных фрагментов указывается для каждого образца



ООО «БиоВитрум»
Россия, 199106, Санкт-Петербург
Большой пр. В.О., д.68, лит. А
Тел./факс: (812) 3050606
info@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрумЮг»
Россия, 344016, г. Ростов-на-Дону
ул. Таганрогская, 128
Тел./факс: +7 (863) 2550305
garegin.khachatryan@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум М»
Россия, 127287, г. Москва,
ул. 2-я Хутурская, д. 38А, стр. 8, этаж 7
Тел./факс: (495) 7874046
moscow@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум»
Казахстан, 010000, Астана
ул. Московская 40, офис 108
Тел./факс: +7 (7172) 592717
kz@biovitrum.ru

ООО «БиоВитрум-Сибирь»
Россия, 630001, г. Новосибирск,
ул. Шорная, 3
Тел./факс: (383) 2304900
sibir@biovitrum.ru

Региональные представители:
Г. Казань
Г. Уфа
Г. Нижний Новгород
Г. Владивосток
Г. Екатеринбург