

## ОБЗОР

УДК 575::612.089/616.529.1-08

МЕТОДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВРОЖДЕННОГО  
БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

А.К. Бейлин, Н.Г. Гурская\*, Е.А. Воротеляк

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;  
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России,  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

\* e-mail: ngurskaya@mail.ru

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это гетерогенная группа редких генодерматозов, характеризующаяся повышенной “ранимостью” кожи, проявляющейся как образование пузырей и незаживающих эрозий на коже и слизистых оболочках внутренних органов при незначительных механических воздействиях. Выделяют три основных типа ВБЭ: простой, пограничный и дистрофический буллезные эпидермолизы, каждый из которых вызывается мутациями в генах, кодирующих соответственно белки эпидермиса, зоны базальной мембраны или дермы; отдельно выделяют — четвертый тип ВБЭ — гемидесмосомный или синдром Киндлер, при котором мутации повреждают ген *FERMT1*, кодирующий белок киндлин-1. Существующие подходы, призванные улучшить состояние больных ВБЭ, находятся на разных стадиях разработки: часть из них уже используют в клинике, для других еще проводятся лабораторные исследования. В зависимости от типа ВБЭ и характера наследования мутации применяются различные стратегии генетической терапии: от заместительной генной терапии с помощью вирусной экспрессии до редактирования генома с помощью программируемых синтетических нуклеаз. Накопленный опыт клеточной терапии по аллогенным и аутологическим пересадкам в сочетании с генной терапией позволяет создать новые подходы к функциональной терапии ВБЭ *ex vivo*.

**Ключевые слова:** врожденный буллезный эпидермолиз, кожа человека, эпидермальные стволовые клетки, генная терапия, ретровирус, редактирование генома, CRISPR/Cas9, TALEN, обзор

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это гетерогенная группа редких генодерматозов, при которых наблюдается высокая чувствительность к небольшим механическим воздействиям. Клинически заболевание проявляется в виде появления пузырей и эрозий, возникающих на коже и слизистых оболочках после незначительной травмы или даже без нее. Эти поражения возникают вследствие генетически обусловленных дефектов структурных белков кожи, обеспечивающих интраэпидермальные или дермоэпидермальные связи [1]. К основным типам ВБЭ относят простой буллезный эпидермолиз (ПБЭ), пограничный буллезный эпидермолиз (ПоБЭ) и дистрофический буллезный эпидермолиз (ДБЭ); последний подразделяется на доминантный ДБЭ (ДДБЭ) и рецессивный ДБЭ (РДБЭ). Отдельно выделяют синдром Киндлер [2].

Для каждого из типов болезни были выявлены гены, мутации в которых ответственны за приобретение фенотипа ВБЭ. В настоящее время известно как минимум 18 генов структурных белков кожи и более 1000 мутаций в них, ассоциированных с развитием клинических проявлений того или иного типа ВБЭ [3–5]. Для обеих форм ДБЭ — это повреждения гена *COL7A1*, кодирующего кол-

лаген VII типа (C7), для ПоБЭ — это мутации генов, вовлеченных в образование ламинина 322 и интегрин  $\alpha\beta 4$ , а также гена *COL17A1*, для ПБЭ — повреждения генов *KRT5* и *KRT14*, а также *PLEC*.

Эффективной терапии больные ВБЭ не получают в силу генетической природы данного заболевания [6]. Однако в настоящее время появляются методы, позволяющие подойти ближе к решению вопроса об эффективном и доступном лечении ВБЭ [7]. Основные исследуемые варианты терапии ВБЭ можно условно разделить на две группы стратегий — *ex vivo* и *in vivo*. В данном обзоре основное внимание уделено методам, лежащим в основе стратегии *ex vivo*, основанной на сочетании генной и клеточной терапии. Данная стратегия включает в себя культивирование первичных клеточных линий, полученных из биоптатов кожи больного, генетическую коррекцию культивируемых клеток и аутологичную трансплантацию трансгенного эквивалента кожи. Важным условием успеха функциональной терапии является наличие в первичных культурах эпидермальных стволовых клеток, поскольку генетическая коррекция этих клеток имеет решающее значение для обеспечения длительного терапевтического эффекта от аутоло-

гической трансплантации. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) из соматических дифференцированных клеток кожи больных обеспечивает неограниченный ресурс для последующей генетической модификации, дифференцировки и пополнения популяции генетически скорректированных клеток. Генетическая терапия аутологичных клеток пациентов с ВБЭ может быть выполнена с помощью разных методов. Наиболее перспективные из них — замещение гена с помощью вирусов, редактирование генов с помощью программируемых нуклеаз и РНК-терапия. Коррекция мутаций предполагает доставку экзогенной кассеты, модифицирующей ген, в клетки-мишени. Низкая эффективность доставки генетического материала в клетки является важным фактором, ограничивающим эффективность методов функциональной терапии *ex vivo*. По способу доставки методы делятся на группы, использующие вирусные системы и невирусные искусственные векторные системы.

### Вирусные стратегии

Исторически первым был метод замещения гена [7, 8]. В этом случае проводилась трансдукция ретровирусом MLV (Mouse Leukemia Virus — вирус лейкемии мышей), в котором экспрессия целевого гена находилась под контролем LTRs (Long Terminal Repeats — длинные концевые повторы) промотора вируса. В первой работе этого цикла у больного с ПоБЭ была выявлена гетерозиготная мутация в гене *LAMB3*, кодирующем субъединицу ламинина 332. Мутация приводит к отсутствию экспрессии этого белка, нарушению дермально-эпидермального соединения и структуры компонентов базальной мембраны. Для генетической коррекции культивировали эпидермальные стволовые клетки и кератиноциты из биопсии кожи больного, после чего проводили ретровирусную трансдукцию вектором, содержащим полноразмерную копию кДНК (комплементарная ДНК) гена *LAMB3*. Трансдуцированные клетки культивировали *in vitro*, выращивали эпидермальный слой и полученный аутологичный кожный эквивалент пересаживали больному. Последующий анализ его тканей показал наличие экспрессии ламинина 332 и восстановление адгезивных свойств клеток в области пересадки. Наблюдение в течение 6 лет показало отсутствие симптомов ПоБЭ — на коже не наблюдалось ни эрозий, ни пузырей, не было воспаления и иммунного ответа на пересадку. Важное достижение в области функциональной терапии ВБЭ было сделано в лаборатории Мишеля де Люка [9]. Мальчику 7 лет, страдающему ПоБЭ, провели серию аутологичных трансплантаций кожных эквивалентов, состоящих в основном из кератиноцитов после трансдукции (ретровирусный вектор с кДНК *LAMB3* был таким же, как описано выше), причем пересадке подвергли практически всю поверхность кожи

ребенка (0,85 м<sup>2</sup>). В течение 3 лет в генетически скорректированных кератиноцитах поддерживалась экспрессия ламинина, при этом не обнаруживались патологические пузыри на коже по всей поверхности тела пациента. В совокупности работы по функциональной терапии ПоБЭ показали, что пересадки генетически скорректированных аутологичных кератиноцитов (среди которых есть эпидермальные стволовые клетки кожи) позволяют получить долгоживущий, функциональный и самообновляющийся трансгенный эпидермис, способный убрать клинические проявления ПоБЭ как минимум на несколько лет.

К сожалению, использование стратегии замещения гена с помощью ретровирусной трансдукции не дало столь положительного эффекта в случае функциональной терапии ДБЭ, где четырем пациентам, страдающим тяжелой формой РДБЭ, сопровождающейся отсутствием синтеза коллагена VII типа, были проведены аутологические трансплантации трансгенных кожных эквивалентов [8]. Ретровирусный вектор содержал полноразмерную копию кДНК гена *COL7A1*. Было показано, что в трансплантируемых кератиноцитах восстанавливается синтез и секреция полноразмерного белка коллагена VII типа. С7 образуется в результате серии посттрансляционных модификаций, секреции и последующего процессинга во внеклеточном матриксе. В коже человека С7 формирует основу фибриллярной части внеклеточного матрикса дермы — прикрепляющие фибриллы папиллярного слоя дермы, в коже больных с РДБЭ прикрепляющие фибриллы не образуются, нарушается структура дермо-эпидермального соединения и возникают пузыри. После пересадки трансгенного эпидермиса в коже больных РДБЭ наблюдалось образование прикрепляющих фибрилл, исчезли раны и пузыри в зонах трансплантации, ткани стали более устойчивыми к механическому воздействию. Однако эффект оказался временным, уже через 6 мес. после трансплантации экспрессия белка снизилась, а через год у всех пациентов вернулись и симптомы заболевания.

Столь разный эффект от заместительной генной терапии и аутологической трансплантации диктует необходимость изучения факторов, определяющих механизмы поддержания эффективности трансплантатов. Сипрашвили и соавт. предполагают, что отличия в эффективности пересадок в случае ПоБЭ и РДБЭ объясняются разным количеством эпидермальных стволовых клеток в трансплантатах, острый недостаток которых наблюдался у больных с ДБЭ [8]. Недостаточное количество стволовых клеток, доступных для пересадок, является фактором, ограничивающим успешность не только генной терапии кератиноцитов, но и аллогенных трансплантаций костного мозга [10]. Секреция ламинина 332 влияет на клетки, которые его продуцируют, стимулируя их адгезию, и создает преимущество в росте для генетически скорректированных клеток.

В случае терапии РДБЭ клетки восстанавливают секрецию структурного белка C7, не связанного непосредственно с системой ростовых факторов, но никаких преимуществ в росте генетически модифицированные клетки не получают. Основное внимание в работах по заместительной генной терапии было сосредоточено на процессе целевой экспрессии корректированного гена без оценки функциональности белкового трансгенного продукта. Данные экспериментов по ретровирусной генной терапии свидетельствуют о необходимости изучения данного вопроса перед введением биомедицинского клеточного продукта в клиническую практику. Для генетической коррекции ВБЭ используются также лентивирусы, способные заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

Поскольку ретровирусы интегрируются в активно транскрибируемые участки ДНК, то использование векторов на их основе потенциально может привести к опухолеобразованию, так как возможны изменение экспрессии и активация неизвестных промоторных областей. Успех данной терапевтической стратегии замещения гена объясняется тем, что в клинической практике после восстановления функций поврежденного белка у больных ВБЭ не было отмечено случаев возникновения иммунного ответа на пересадку, не было обнаружено онкологических трансформаций.

#### *Использование неинтегрируемых вирусных систем*

Этот подход основан на применении аденоассоциированных вирусных векторов (AAV — Adeno-Associated Viruses), при использовании которых риск мутагенеза, опосредованного случайным встраиванием определенных элементов в геном, снижен. Для эффективной трансфекции первичных кератиноцитов человека применяют вирусную систему AAV на основе серотипов 2, 6 и 8 [11]. Например, трансдукция AAV использовалась для генной терапии ПБЭ, проводили коррекцию мутации в *KRT14*, вызывающей тяжелую форму ПБЭ — подтип Доулинг-Меара (Dowling-Meara type epidermolysis bullosa simplex). Эпидермальные стволовые клетки больного были подвергнуты успешной трансдукции AAV серотипа 6. Миссенс-мутация в *KRT14*, приводящая к замене аргинина 125 на цистеин в цитокератине 14, имеет доминантно-негативный характер проявления, в таких случаях нокаут мутантного аллеля в клетках больного может привести к появлению белка с нормальной функцией за счет работы второго, не мутантного, аллеля. В последовательность 3-го экзона *KRT14* вносили нуклеотидную последовательность зеленого флуоресцентного белка под контролем IRES (Internal Ribosome Entry Site — участок внутренней посадки рибосомы). На проточном цитофлуориметре отбирались клетки, по зеленой флуоресценции которых можно было выявить процесс инсерции и разрушения

рамки считывания мутантного гена *KRT14*, в результате чего отбирались клоны с “выключенной” экспрессией мутантного аллеля *KRT14* [12]. Пересадка генетически скорректированных кожных эквивалентов иммунодефицитным мышам прошла успешно, и дальнейшие исследования продемонстрировали, что пересаженный эпидермальный слой имеет нормальную структуру. Авторы отмечают, что кожный эквивалент, полученный из отдельной клетки, состоял из  $10^{13}$  клеток, в работе подчеркивается возможность использования пролиферативного потенциала одной стволовой клетки для наработки функционального эпидермального эквивалента, достаточного для пересадок на большие поверхности кожи.

Успешное использование векторов на основе аденоассоциированных вирусов для функциональной терапии ДБЭ было продемонстрировано Чаморро с соавт. на кератиноцитах больного, в этой работе была произведена коррекция специфической мутации в гене *COL7A1* [13]. Системы на основе AAV используются при генной терапии кератиноцитов в качестве донорных матриц для гомологической рекомбинации (см. ниже), поскольку в результате вирусной трансдукции в клетке синтезируются одноцепочечные молекулы ДНК, увеличивающие эффективность гомологичной рекомбинации [14]. Интересный методический подход к генетической терапии гена *LAMA3* с помощью AAV представлен в статье Мело с соавт. [15]. Был получен новый серотип вируса AAV с высокой активностью рекомбинации — AAV-DJ, при помощи которого происходила эффективная генетическая коррекция в кератиноцитах. Вектор AAV содержал фрагмент гена *LAMA3* дикого типа с экзонами 43 и 44. Мутантный аллель данного гена больного ребенка с ПоБЭ содержал сбой рамки считывания и предварительный стоп-кодон (ПСК) в экзоне 45, в клетках происходила деградация мРНК мутантного гена *LAMA3*, в результате белок ламинин не синтезировался. Деградация молекул мРНК, несущих ПСК, происходит в клетках за счет работы системы NMD (нонсенс-опосредованной деградации мРНК, от англ. NMD — Nonsense Mediated Decay). В данном случае при экспрессии с вирусной кассеты восстанавливалась открытая рамка считывания, что в итоге, после гомологичной рекомбинации, приводило к появлению немутантного *LAMA3* и синтезу функционального белка, ламинина- $\alpha 3$ , являющегося субъединицей гетеротримерного ламинина 332. Важной особенностью работы являлась стратегия функционального положительного отбора и селективной наработки целевых клеток, которые приобретали способность к адгезии и росту за счет восстановленной функции ламинина 332. Вирусные стратегии генной терапии имеют преимущества, связанные с хорошей эффективностью доставки генетического материала в клетки и способностью заражать различные типы клеток, но обладают существенным ограничением



в емкости векторов, что исключает их использование для коррекции длинных генетических последовательностей.

### Невирусные стратегии генной терапии

Основным преимуществом трансфекций невирусными векторами является более безопасный профиль интеграции, низкая токсичность и низкая иммуногенность не содержащих вирусные последовательности векторов [16]. Однако эффективность доставки экзогенной генетической кассеты в клетки ограничена эффективностью трансфекции, которая, как правило, для таких клеток, как кератиноциты человека, является низкой. Этот недостаток преодолевается селективным отбором трансфицированных клеток с помощью дополнительных инструментов. Для этого в плазмиды, несущие фрагменты последовательности корректируемых генов без мутаций, встраивают гены флуоресцентных маркеров или гены устойчивости к антибиотикам. После трансфекции клеток плазмидами отбирают клоны с помощью проточной цитофлуориметрии или по способности роста на селективной среде.

С началом нового периода в генной терапии — использованием программируемых синтетических нуклеаз для редактирования генома — важным этапом стало увеличение эффективности временной трансфекции, с помощью которой осуществляют доставку нуклеазной системы в клетки, а получение трансгенных линий клеток с постоянной экспрессией перестало быть столь актуальной задачей [17].

### Стратегии редактирования геномов

С развитием технологии направленных воздействий на геном клетки область функциональной генной терапии стала развиваться очень быстро. Активность синтетических нуклеаз можно специфически “запрограммировать” или направить на необратимое изменение нуклеотидной последовательности гена в области мутации (ДНК-мишени), причем направленное изменение последовательности будет достигаться без интеграции провирусных или каких-либо других дополнительных последовательностей. Для редактирования геномов используются синтетические нуклеазы: домены цинковых пальцев (ZFN — Zinc Finger Nuclease), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases — эффекторные нуклеазы, подобные транскрипционным активаторам), домены и системы CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr-Associated protein — регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов/белок, ассоциированный с этими повторами), с помощью которых можно нокаутить целевой ген или заменить его для восстановления функции белка [18]. Основными преимуществами данной технологии является возможность наце-

лить данную систему на любую последовательность в геноме с сохранением эндогенных промоторов для экспрессии гена.

TALEN — это химерные белки, которые состоят из нуклеазного домена и ДНК-связывающего TALE-домена — транскрипционного фактора, ведущего свое происхождение от растительного патогена. Каждый ДНК-связывающий домен состоит из расположенных тандемно 35 аминокислотных повторов, а каждый такой повтор, в свою очередь, узнает только один нуклеотид в большой бороздке ДНК. Таким образом набор TALE-доменов узнает уникальную последовательность ДНК длиной 20 нуклеотидов. Эта синтетическая система способна специфически узнавать любую последовательность ДНК. Недостатки TALEN-доменов заключаются в трудоемкости и сложности их клонирования. При необходимости изменить последовательность для редактирования на другую нужно полностью изменить дизайн TALE и клонировать *de novo* всю химерную молекулу TALEN [19, 20].

В отличие от функционирования белков TALEN действие системы CRISPR/Cas направляется некодирующей РНК. CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами и разделенные уникальными последовательностями (спейсерами), Cas — нуклеаза, разрезающая чужеродную ДНК, специфичность такого разрезания определяется короткими некодирующими РНК, узнающими и связывающими последовательность ДНК-мишени. Название системы отражает ее прокариотическое происхождение, это часть иммунной системы прокариот, насчитывающая несколько похожих семейств. Самое широкое применение на сегодня имеет белок Cas9 (или spCas9, поскольку белок выделен из *Streptococcus pyogenes*), CRISPR/Cas9 относится ко II типу CRISPR-систем, в которых CRISPR-участки транскрибируются, процессируются и в соединении с транс-активирующей РНК crRNA (tracrRNA) образуют так называемую направляющую РНК (guide RNA), которая, комплементарно взаимодействует с целевым фрагментом ДНК, осуществляя узнавание ДНК-мишени. Связавшись с ДНК, эти РНК взаимодействуют с Cas9-нуклеазой, которая конформационно перестраивается и активируется для разрезания ДНК [21]. Необходимым элементом системы является наличие в ДНК трехнуклеотидного ПАМ-мотива (ПАМ — прилегающий к протоспейсеру участок последовательности ДНК, от англ. PAM — Protospacer Adjacent Motive), имеющего структуру 5'-NGG-3', где N — любой нуклеотид. ПАМ должен находиться в ДНК рядом с участком узнавания направляющей РНК. Активированная Cas9 разрезает ДНК примерно в 4 нуклеотидах от ПАМ, образуя двухпочечный разрыв. Нуклеазная система CRISPR/Cas9 не требует дизайна *de novo* белка для узнавания каждой новой мишени. Необходимо лишь подобрать последовательность,

содержащую ПАМ, и синтезировать специфическую направляющую РНК.

Важной особенностью и недостатком системы CRISPR/Cas является ее нецелевая активность, когда направляющая РНК отжигается неспецифически и способствует разрезанию другой последовательности, часто локализованной в другом гене, на другой хромосоме. Эта активность может явиться причиной летальных изменений физиологии редактируемой клетки [22]. Существует несколько десятков программ и онлайн-ресурсов, позволяющих предсказать эффективность, специфичность и неспецифическую активность направляющих РНК [23]. Основная задача после проведения редактирования заключается в отборе таких клеток, в которых прошел процесс специфического редактирования, но нет неспецифических мутаций в других последовательностях [20]. Для получения трансгенных эпидермальных клеточных эквивалентов, пригодных для аутологичной трансплантации больным, могут быть использованы только отредактированные клетки, проверенные с помощью полногеномного секвенирования.

Кроме Cas9, в работах по редактированию генома используются разные мутантные варианты этого белка: Cas9n D10A [24]; BE-HF1,2,4; FokI-dCas9; espCas9 [25]; Нура-Cas9 [26], а также другие системы, например, Cpf1 (CRISPR/Cas12, система V-типа, выделенная из *Streptococcus aureus*), использующие другую последовательность нуклеотидов ПАМ.

Механизм действия синтетических нуклеаз сводится к образованию двухцепочечных разрывов в геномной ДНК, которые затем репарируются в клетке с помощью, в основном, двух различных механизмов: негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ – Non-Homologous End Joining) и гомологичной рекомбинации (HDR – Homology Directed Repair) [17]. NHEJ приводит к накоплению инсерций и делеций в клетке, часто – к сбою рамки считывания. Это самый простой и эффективный способ редактирования гена, при котором мутации в различных локусах аллеля могут быть исключены за счет работы одной запрограммированной нуклеазы. Данный путь репарации часто создает “нокаутные” мутанты целевого гена [19]. Гомологичная рекомбинация приводит к замене последовательности ДНК с мутацией в геноме на последовательность дикого типа. Частота спонтанной HDR в клетках значительно меньше чем NHEJ, гомологичная рекомбинация проходит в клетках только на определенных стадиях клеточного цикла: в конце фазы синтеза (S-фазы) и в постсинтетической фазе (G2-фазе). Из-за этого эффективность исправления мутаций с помощью гомологичной рекомбинации невысока. Для процесса исправления мутации необходимо присутствие в клетке экзогенной донорной последовательности ДНК, причем в значительных количествах (донорная последовательность может быть в виде одноцепо-

точного фрагмента ДНК и в виде плазмидной ДНК). Донорная плазида должна содержать исправленный вариант мутации, окруженный последовательностями (от 200 до 1000 нуклеотидов), так называемыми “плечами гомологии”.

В первой работе TALEN-опосредованное редактирование гена было осуществлено на клетках больного с диагнозом РДБЭ, когда посредством гомологичной рекомбинации устранили ПСК в гене *COL7A1* [27]. В фибробластах больного после геномного редактирования появилась экспрессия С7, но поскольку первичные клетки имеют ограниченную продолжительность жизни, авторы получили изогенные иПСК из клеток после генетической коррекции, проверив затем отредактированные иПСК на мышах *in vivo*, они получили кожные тератомные модели из прошедших редактирование клеток. В следующей работе по генетическому редактированию гена *COL7A1*, о которой уже говорилось выше при описании системы AAV, для коррекции ПСК использовали оба механизма репарации – NHEJ и HDR [13]. Изучаемая мутация c6527insC часто встречается в Испании у больных с диагнозом РДБЭ и приводит к появлению ПСК. Для доставки нуклеазной системы TALEN и донорной ДНК использовали AAV-систему, о которой уже говорилось выше. С помощью HDR были получены отдельные клоны с экспрессией С7 на физиологическом уровне. Воздействие TALEN на геномную ДНК без донорной последовательности привело к образованию набора делеций и инсерций, в том числе в ряде случаев произошло нарушение рамки считывания, в результате удалось найти и отобрать несколько клонов с восстановленной открытой рамкой считывания *COL7A1*. В обоих случаях (NHEJ- и HDR-опосредованной репарации) были выявлены синтез С7 и образование структур, похожих на прикрепляющие фибриллы человека, при пересадке трансгенных эпидермальных эквивалентов кожи иммунодефицитным мышам.

В работе Шинкума с соавт. использовалось редактирование гена для нокаута гетерозиготной мутации в экзоне 109 *COL7A1*, вызывающей ДДБЭ [28]. Эта мутация приводила к делеции 15 п.о., образующийся продукт транслировался в рамке считывания *COL7A1* и формировал нефункциональный тример С7. Редактирование проводили на иПСК, полученных из первичных фибробластов человека, несущих мутацию. Редактирование фрагмента гена *COL7A1* осуществлялось по механизму негомологичной рекомбинации NHEJ с помощью TALEN-нуклеазы и параллельно – с помощью системы CRISPR/Cas9. Оказалось, что система CRISPR/Cas9 осуществляет редактирование приблизительно в 2–3 раза эффективнее, поэтому далее для работы на иПСК использовали только CRISPR/Cas9. При трансфекции иПСК использовали смесь плазмид – первая кодировала spCas9, вторая – направляющую РНК, в каждой плазмиде

содержались кДНК одного из генов флуоресцентных репортеров с эмиссией в зеленой или в красной области спектра (для последующего отбора трансфицированных клеток на проточном цитофлуориметре). Были отобраны четыре клона с мутациями, сдвигающими рамку считывания мутантного аллеля. Эта мутация приводила к появлению ПСК, и ожидалось, что произойдет деградация мРНК за счет работы механизма NMD, однако количество мРНК не снизилось, синтезировался укороченный белок. Подобное явление было описано ранее для другой мутации с появлением ПСК в гене *COL7A1*, также не приводящей к деградации мРНК по непонятным причинам [29]. Полученный в результате геномного редактирования укороченный белок не взаимодействовал с нормальным белком С7 и не был способен к тримеризации, то есть этот продукт являлся менее токсичным для клетки, чем исходный вариант белка С7, несущий мутацию ДДБЭ. Авторы отметили преимущества использования иПСК для редактирования генома клеток больных ДБЭ: иПСК имеют неограниченный потенциал деления и самообновления, что важно при наращивании клеточной массы из единичных отредактированных клеток; иПСК могут быть дифференцированы в различные типы клеток, в данном случае для реконструкции кожного эквивалента важно получение из отредактированных иПСК как фибробластов, так и кератиноцитов, поскольку и первые, и вторые способны продуцировать и секретировать белок С7. В данной работе показано, что с помощью специфических нуклеаз и высокоэффективной нехомологичной рекомбинации, приводящей к нокаутам гена, можно восстановить продукцию функционального белка С7 в клетках. Похожий метод редактирования генома иПСК с помощью CRISPR/Cas9 описывается в работах на другом типе ДБЭ – РДБЭ [30, 31].

Программируемые нуклеазы применяли для генной терапии других типов ВБЭ, в частности, ПБЭ, для редактирования доминантно-негативных мутаций в цитокератинах 14 и 5. В первом случае использовали улучшенный вариант Cas9 – Cas9D10A (никазу) – для генетической коррекции мутации в экзоне 6 *KRT14* [12, 24]. Во втором – на матрице *KRT5* – осуществляли редактирование TALEN-доменами для создания клеточных линий, несущих мутации ПБЭ и их последующей коррекции [19].

В последней работе была получена также делеция мутантного аллеля гена *KRT5*, причем редактирование было осуществлено на иммортализованных клетках пациента. В результате редактирования и удаления мутантного аллеля, имеющего доминантно-негативный характер проявления, в клетках восстановилась нормальная архитектура сети цитокератинов, исчезли внутриклеточные агрегаты, наблюдаемые у больного с ПБЭ. С помощью данной стратегии редактирования удалось направ-

ленно ввести ПСК в 5'-область кодирующей части гена. Появление ПСК вызвало деградацию мРНК редактируемого гена за счет механизма NMD. После редактирования популяция клеток представляла собой смесь клонов, прошедших редактирование нормального аллеля, мутантного аллеля, а также клонов дикого типа. Среди полученных после редактирования клеток необходимо было выбрать те, в которых произошел “нокаут” мутантного аллеля. Это осуществили с помощью биохимического и функционального анализа, отбирая клетки с нормальной структурой цитокератиновой сети.

В работе Кочера и соавт. использовалась Cas9D10A (никаза) для редактирования мутации в *KRT14* при ПБЭ [24]. Важным преимуществом никазы является ее сниженная нецелевая активность. Мутация в экзоне 6 *KRT14* встречается с высокой частотой и вызывает генерализованный тяжелый ПБЭ, никаза была направлена специфически на интрон 7, в результате последующей гомологичной рекомбинации происходило встраивание интактной копии гена и восстановление функции *KRT14*.

### РНК-терапия

Особенностью подходов, объединенных названием РНК-терапия, является то, что коррекция мутации происходит только на уровне мРНК; для восстановления функции поврежденного мутацией белка используются механизмы, лежащие в основе процессинга и сплайсинга РНК.

Первый метод основан на использовании антисенс-олигонуклеотидов для специфического выключения экзона. Пример использования – терапия РДБЭ, когда выключению подвергали экзоны гена *COL7A1*. Эффективность подхода была показана при выключении целого ряда экзонов (70, 73, 80, и 105) гена *COL7A1*; при трансплантации клеток мышам наблюдалось увеличение экспрессии *COL7A1* в зоне базальной мембраны [32]. Необходимо добавить, что выключению могут быть подвергнуты лишь экзоны, находящиеся в одной рамке считывания, что ограничивает использование данного метода. Антисенс-олигонуклеотиды успешно используются в клинике, причем часто для функциональной терапии *in vivo*, которая предполагает непосредственно вносить терапевтические агенты в организм больного для коррекции сплайсинга во всех органах и тканях.

Второй метод – SMarT-технология (Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing – опосредованный сплайсосомой транс-сплайсинг) – использует сплайсинг РНК, но вместо обычного цис-сплайсинга, когда соединяются экзоны, принадлежащие одной молекуле пре-мРНК, происходит транс-сплайсинг, в процессе которого соединяются экзоны, принадлежащие разным молекулам пре-мРНК. Таким образом можно соединить экзоны без мутации, заменяя участки последовательности пре-мРНК,



несущие мутации, их копиями “дикого типа”. Последние вводятся в клетку в виде экзогенных плазмид, кодирующих часть пре-мРНК, а также необходимые для сплайсинга элементы: точку ветвления, полипиримидиновый тракт и “связывающий домен”. “Связывающий домен” — это фрагмент, обеспечивающий ингибирование конкурирующего процесса цис-сплайсинга, за счет специфического связывания с эндогенной последовательностью пре-мРНК в области экзон-интронного соединения.

РНК-транс-сплайсинг как терапевтическая стратегия применяется и проходит стадию доклинических испытаний на мышах для белков PLEC, KRT14, COL17A1 и COL7A1 [33]. Первым успешным применением терапии мутаций ВБЭ с помощью транс-сплайсинга стало редактирование мутации гена *PLEC1* [34]. мРНК этого гена — 14,2 тысячи нуклеотидов — является одной из самых длинных, что сильно осложняет эффективность клонирования и трансфекции. Одним из преимуществ транс-сплайсинга является возможность использовать последовательность меньшей длины (поскольку в векторе для доставки вместо полноразмерной копии кДНК используется лишь фрагмент кДНК). Плазида для транс-сплайсинга содержала фрагмент 5'-кодирующей части и оказалась способной скорректировать все мутации, которые могли встретиться в этой области гена. Важным полезным свойством SmaRT-технологии является возможность применения одного и того же вектора для коррекции разных мутаций, локализованных в данном участке гена. Это выгодно отличает подход SmaRT от метода с программируемыми нуклеазами, где коррекция каждой мутации требует индивидуального подхода, и тем более важно, что из-за множественности мутаций, провоцирующих ВБЭ, разработка специальных терапевтических подходов персонально к каждому случаю представляется

довольно затратной. К достоинствам метода транс-сплайсинга относится сохранение эндогенного контроля генной экспрессии после коррекции мутации, что объединяет транс-сплайсинг с методами геномного редактирования. Существенным ограничением SmaRT является низкая эффективность самого процесса транс-сплайсинга, которая накладывается на возможную низкую эффективность трансфекции клеток. SmaRT удачно применяется для терапии рецессивных мутаций, когда появление в клетке даже небольших количеств функционального белка способно заметно снизить токсичность и скорректировать межклеточные взаимодействия.

Таким образом, ВБЭ — это гетерогенная группа генодерматозов, которая подразделяется на подтипы в зависимости от локализации поражения, его тяжести, вовлеченных в патогенез белков и типа мутации. За последние годы достигнут значительный прогресс в развитии методов функциональной терапии *ex vivo*, приближающей нас к применению концепции персонализированной медицины. Помимо заместительной генной терапии на основе вирусов перспективно использование программируемых синтетических нуклеаз для коррекции мутаций в аутологических клетках человека. Сочетание методов редактирования геномов и аутологических трансплантаций приводит к появлению новых биомедицинских клеточных продуктов. Некоторые методы уже применяются в клинической практике, другие — имеют большое потенциальное преимущество, но еще требуют дальнейшей лабораторной разработки до того, как будут введены в клинику.

*Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (Госзадание №0108-2018-0009).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Has C., Bruckner-Tuderman L. The genetics of skin fragility // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2014. Vol. 15. P. 245–268.
2. Fine J.D., Eady R.A., Bauer E.A. et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the third international consensus meeting on diagnosis and classification of EB // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008. Vol. 58. N 6. P. 931–950.
3. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., Christiano A.M., McGrath J.A., Has C., South A.P., Kopelan B., Robinson E.C. Progress toward treatment and cure of epidermolysis bullosa: Summary of the DEBRA international research symposium EB2015 // *J. Invest. Dermatol.* 2016. Vol. 136. N 2. P. 352–358.
4. Lee J.Y.W., Liu L., Hsu C.K., Aristodemou S., Ozomena L., Ogboli M., Moss C., Martinez A.E., Mellerio J.E., McGrath J.A. Mutations in KLHL24 add to the molecular heterogeneity of epidermolysis bullosa simplex // *J. Invest. Dermatol.* 2017. Vol. 137. N 6. P. 1378–1380.

5. McGrath J.A. Recently identified forms of epidermolysis bullosa // *Ann. Dermatol.* 2015. Vol. 27. P. 658–666.
6. Cohn H.I., Teng J.M. Advancement in management of epidermolysis bullosa // *Curr. Opin. Pediatr.* 2016. Vol. 28. N 4. P. 507–516.
7. Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provati E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. N 2. P. 1397–1402.
8. Siprashvili Z., Nguyen N.T., Gorell E.S., Loutit K., Khuu P., Furukawa L.K., Lorenz H.P., Leung T.H., Keene D.R., Rieger K.E., Khavari P., Lane A.T., Tang J.Y., Marinkovich M.P. Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *JAMA.* 2016. Vol. 316. N 17. P. 1808–1817.
9. Hirsch T., Rothoef T., Teig N., et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells // *Nature.* 2017. Vol. 551. N 7680. P. 327–332.

10. Bauer J.W., Koller J., Murauer E.M., De Rosa L., Enzo E., Carulli S., Bondanza S., Recchia A., Muss W., Diem A., Mayr E., Schlager P., Gratz I.K., Pellegrini G., De Luca M. Closure of a large chronic wound through transplantation of gene-corrected epidermal stem cells // *J. Invest. Dermatol.* 2017. Vol. 137. N 3. P. 778–781.
11. Sallach J., Di Pasquale G., Larcher F., Niehoff N., Rübsam M., Huber A., Chiorini J., Almarza D., Eming S.A., Ulus H., Nishimura S., Hacker U.T., Hallek M., Niessen C.M., Büning H. Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy // *Mol. Ther.* 2014. Vol. 22. N 5. P. 929–939.
12. Petek L.M., Fleckman P., Miller D.G. Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex // *Mol. Ther.* 2010. Vol. 18. N 9. P. 1624–1632.
13. Chamorro C., Mencía A., Almarza D., Duarte B., Büning H., Sallach J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. Gene editing for the efficient correction of a recurrent *COL7A1* mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2016. Vol. 5:e307.
14. Khan I.F., Hirata R.K., Russell D.W. AAV-mediated gene targeting methods for human cells // *Nat. Protoc.* 2011. Vol. 6. N 4. P. 482–501.
15. Melo S.P., Lisowski L., Bashkirova E., Zhen H.H., Chu K., Keene D.R., Marinkovich M.P., Kay M.A., Oro A.E. Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant // *Mol. Ther.* 2014. Vol. 22. N 4. P. 725–733.
16. Gorell E., Nguyen N., Lane A., Siprashvili Z. Gene therapy for skin diseases // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014. Vol. 4:a015149.
17. March O.P., Reichelt J., Koller U. Gene editing for skin diseases: designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders // *Exp. Physiol.* 2018. Vol. 103. N 4. P. 449–455.
18. Perdoni C., Osborn M.J., Tolar J. Gene editing toward the use of autologous therapies in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *Transl. Res.* 2016. Vol. 168. P. 50–58.
19. Aushev M., Koller U., Mussolino C., Cathomen T., Reichelt J. Traceless targeting and isolation of gene-edited immortalized keratinocytes from epidermolysis bullosa simplex patients // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017. Vol. 6. P. 112–123.
20. Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation // *Science.* 2014. Vol. 343. N 6176. P. 1247997.
21. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F. 3rd Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N 21. P. 9779–9785.
22. Koo T., Lee J., Kim J.S. Measuring and reducing off-target activities of programmable nucleases including CRISPR-Cas9 // *Mol. Cells.* 2015. Vol. 38. N 6. P. 475–481.
23. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools // *Interdiscip. Sci.* 2018. Vol. 10. N 2. P. 455–465.
24. Kocher T., Peking P., Klausseger A., Murauer E.M., Hofbauer J.P., Wally V., Lettner T., Hainzl S., Ablinger M., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. Cut and paste: efficient homology-directed repair of a dominant-negative KRT14 mutation via CRISPR/Cas9 nickases // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25. N 11. P. 2585–2598.
25. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science.* 2016. Vol. 351. N 6268. P. 84–88.
26. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy // *Nature.* 2017. Vol. 550. N 7676. P. 407–410.
27. Osborn M.J., Starker C.G., McElroy A.N. et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa // *Mol. Ther.* 2013. Vol. 21. P. 1151–1159.
28. Shinkuma S., Guo Z., Christiano A.M. Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Vol. 113. N 20. P. 5676–5681.
29. Saito M., Masunaga T., Teraki Y., Takamori K., Ishiko A. Genotype-phenotype correlations in six Japanese patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa with the recurrent p.Glu2857X mutation // *J. Dermatol. Sci.* 2008. Vol. 52. N 1. P. 13–20.
30. Webber B.R., Osborn M.J., McElroy A.N., Twaroski K., Lonetree C.L., DeFeo AP, Xia L., Eide C., Lees C.J., McElmurry R.T., Riddle MJ, Kim C.J., Patel D.D., Blazar B.R., Tolar J. CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *NPJ Regen. Med.* 2016. Vol. 1:16014.
31. Itoh M., Kiuru M., Cairo M. S., Christiano A.M. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. P. 8797–8802.
32. Turczynski S., Titeux M., Tonasso L., Décha A., Ishida-Yamamoto A., Hovnanian A. Targeted exon skipping restores type VII collagen expression and anchoring fibril formation in an in vivo RDEB model // *J. Invest. Dermatol.* 2016. Vol. 136. N 12. P. 2387–2395.
33. Koller U., Hainzl S., Kocher T., Hüttner C., Klausseger A., Gruber C., Mayr E., Wally V., Bauer J.W., Murauer E.M. Trans-splicing improvement by the combined application of antisense strategies // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. N 1. P. 1179–1191.
34. Wally V., Klausseger A., Koller U., Lochmüller H., Krause S., Wiche G., Mitchell L.G., Hintner H., Bauer J.W. 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene // *J. Invest. Dermatol.* 2008. Vol. 128. N 3. P. 568–574.

Поступила в редакцию  
25.07.2018

Принята в печать  
28.09.2018



## REVIEW

METHODS OF GENE THERAPY FOR TREATMENT  
OF INHERITED EPIDERMOLYSIS BULLOSA*A.K. Beilin, N.G. Gurskaya\*, E.A. Vorotelyak**Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,  
Vavilova ul. 26, 119334, Moscow, Russia;**Pirogov Russian National Research Medical University,  
Ostrovitianov ul. 1, 117997, Moscow, Russia**\* e-mail: ngurskaya@mail.ru*

Inherited epidermolysis bullosa (EB) is a heterogeneous group of rare genodermatoses with a high skin fragility manifested by the formation of destructive blisters and non-healing erosions on the skin and mucous membranes as a reaction to minor mechanical influences. There are three main types of EB: simple, junctional and dystrophic, each is caused by mutations in genes that encode epidermal, zones of the basement membrane or dermis proteins, respectively. The fourth type of EB is also described – hemidesmosomal or Kindler syndrome with impairments in kindlin-1 protein encoded by the *FERMT1* gene. The existing ways to improve the living conditions of patients with EB are at different stages of development: some of them are already used in the clinic, while others are still under laboratory research. Various strategies are used, depending on the type of EB and the nature of mutation inheritance: from the functional gene replacement therapy based on the viral expression to the genome editing methods by programmable synthetic nucleases. The accumulated experience of allogeneic and autologous transplants of skin equivalents opens the prospect for using new approaches to functional gene and cell therapy *ex vivo*.

**Keywords:** *inherited epidermolysis bullosa, human skin, epidermal stem cells, gene therapy, retrovirus, genome editing, CRISPR/Cas9, TALEN, review*

**Сведения об авторах**

*Бейлин Аркадий Константинович* — аспирант Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, мл. науч. сотр. отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-434-12-83;

e-mail: arkadii.beilin@gmail.com

*Гурская Надежда Георгиевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова.

Тел: 8-495-434-12-83; e-mail: ngurskaya@mail.ru

*Воротеляк Екатерина Андреевна* — докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, зав. отделом регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова, зав. лабораторией клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru