

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ В ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ

© 2022 г. А. В. Иваненко^а, Н. А. Евтушенко^а, Н. Г. Гурская*

^а Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117998 Россия

*e-mail: ngurskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

В представленном обзоре рассмотрены перспективы использования новых подходов к терапии генодерматозов и методы коррекции этих наследственных заболеваний кожи. Большое число генотерапевтических методов применено в попытках коррекции или терапии заболеваний группы врожденного буллезного эпидермолиза. Замещение поврежденного гена с использованием вирусных и невирусных методов доставки сменилось редактированием генома с помощью программируемых нуклеаз. Основное внимание уделено широко используемым методам, применяемым *in vitro* на клетках различного типа. Выбор стратегии редактирования зависит от типа мутации, вызывающей заболевание, характера ее наследования и нуклеотидного окружения мутации. Рассмотрены модели заболеваний на животных, полученные с помощью редактирования генома. Суммирован опыт разработки методов редактирования генома и их применения в терапии генодерматозов, признанных ранее неизлечимыми.

Ключевые слова: генодерматоз, врожденный буллезный эпидермолиз, доминантная мутация, рецессивная мутация, эпидермальные кератиноциты, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, программируемая нуклеаза, редактирование генома, репарация, рекомбинация, трансгенные клетки, генотерапия, трансплантация

DOI: 10.31857/S0026898422060118

ВВЕДЕНИЕ

Методы генной терапии генодерматозов – наследственных заболеваний кожи, условно можно подразделить на методы, используемые *in vivo* (группа 1) и *in vitro* (группа 2). Кожа – это один из органов, наиболее перспективных для осуществления генетических манипуляций, поскольку это наружный орган, клетки которого доступны для генных пушек, наночастиц, микроигл и кремов, содержащих генотерапевтические кассеты. Перечисленные методы относятся к методам первой группы. Расширенное использование методов второй группы определяется простотой получения биопсийного материала кожи, возможно-

стью выделять клетки из малых количеств биоматериала, относительной легкостью поддержания клеток в условиях культуры [1]. Важна также “доступность” клеток для трансфекции и вирусной трансдукции, эффективность которых зависит от способов доставки генетического материала.

Выращенные *in vitro* пласты трансгенных клеток кожи (эпидермальных кератиноцитов и фибробластов), называемые трансгенными графтами, можно вернуть (трансплантировать) тому же пациенту. Успех аутологичной трансплантации во многом зависит от количества стволовых клеток, подвергнутых генетической коррекции, природы генетического нарушения, а также от вовлеченности других органов и систем в патогенез исследуемого заболевания. Технология замещения гена применяется в терапии генодерматозов относительно давно, достигая в ряде случаев устойчивых и долговременных терапевтических эффектов [2]. Показано, что при замещении гена с помощью вирусной трансдукции опасность развития онкологических изменений в коже ниже, чем в клетках крови, кроме того, на коже легче раньше выявить новообразование [3]. Кратко пе-

Сокращения: БЭ – буллезный эпидермолиз; ВБЭ – врожденный буллезный эпидермолиз; ДЭБ – дистрофический БЭ; БЭП – простой БЭ; ДДБЭ – доминантный дистрофический БЭ; РДБЭ – рецессивный дистрофический БЭ; ПоБЭ – пограничная форма БЭ; *KRT* – гены кератинов; *COL7A1* – ген α -1-цепи коллагена типа VII; *C7* – α -цепь коллагена VII; ДЦР – двухпочечный разрыв; HR – гомологичная рекомбинация; HDR – направленная гомологичная рекомбинация; с-NHEJ – канонический путь негомологичного соединения концов; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

речислим другие факторы, ограничивающие использование вирусных векторов в генотерапии. Во-первых, сильные нерегулируемые вирусные промоторы искажают регуляцию экспрессии гена, которая в клетках в норме изменяется в зависимости от дифференцировочного статуса и межклеточных взаимодействий; во-вторых, случайная интеграция провируса в геном требует дополнительной проверки трансгенных линий клеток для исключения возможных онкотрансформаций; в-третьих, вероятность метилирования промоторов, а, следовательно, постепенное “замалчивание” экспрессии и, наконец, сложность доставки фрагментов большой длины (например, длина кодирующей области генов *COL7A1* и *PLEC* составляет около 9 и 14 т.п.н. соответственно). Все эти факторы не позволяют рассматривать метод замещения гена как приоритетный, особенно при сравнении с быстро развивающимися стратегиями направленного редактирования генома.

С редактированием геномов с помощью программируемых нуклеаз связано наибольшее количество методов и технологий. Важными преимуществами геномного редактирования является сохранение эндогенной регуляции экспрессии редактируемого гена, что определяет паттерн экспрессии и дифференцировки клеток, отсутствие трансгенных последовательностей в геноме, а также возможность редактирования популяций стволовых клеток и их репрограммирования с целью получения клеток разного типа. Одной из первых групп генодерматозов, к которым начали применять новые методы генотерапии и редактирования геномов, стала группа орфанного заболевания – врожденного буллезного эпидермолиза (ВБЭ). К настоящему моменту к ВБЭ применены почти все основные варианты редактирования генома с использованием TALEN-доменов, системы CRISPR/Cas9, сначала на первичных пациент-специфичных клетках, а затем и с использованием стволовых клеток. Например, компания “CRISPR THERAPEUTICS AG” США запатентовала (патент WO/2018/154413) редактирование генома при дистрофическом буллезном эпидермолизе (ДЭБ) и других состояниях или заболеваниях, связанных с геном *COL7A1*, кодирующим α -1-цепь коллагена типа VII (С7) [4].

После редактирования генома и полноэкзомного секвенирования первичные клетки кожи пациентов (кератиноциты и фибробласты) могут использоваться для локализованной терапии – аутологичной трансплантации трансгенного клеточного продукта, полученного при соблюдении правил надлежащей производственной практики (GMP) и проведения доклинических испытаний на животных [5, 6]. После этого за пациентом наблюдают в течение длительного времени, анализируют состояние кожи в зонах трансплантации и динамику восстановления экспрессии целевых

белков в местах поражений. Есть сообщения о снижении клинических проявлений заболевания в первые 3–6 месяцев после успешной трансплантации, но затем состояние пациентов ухудшалось [6].

Пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), получаемые из первичных клеток, могут использоваться для редактирования генома и получения изогенных клеток различного типа, не только фибробластов и эпидермальных кератиноцитов, но также гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток. Использование полученных из иПСК клеток в аутологичных трансплантациях имеет ряд ограничений, связанных с возможным риском злокачественного перерождения, обусловленного не полным репрограммированием иПСК. Тем не менее, использование иПСК имеет огромное значение для изучения перспектив применения генной и клеточной терапии при ВБЭ. Возможность редактирования генома стволовых клеток важна для создания уникальной популяции возобновляемых изогенных пациент-специфичных клеток без патологической мутации.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Генодерматозы – гетерогенная группа наследственных, в основном моногенных, заболеваний кожи, различающихся характером повреждений, уровнем их образования в коже и характером наследования мутаций. Мы сфокусируем внимание на генодерматозах с герминативными мутациями, оставляя широкую группу других многофакторных заболеваний (псориаз, атопический дерматит и нейродермит) вне рассмотрения. К генодерматозам относятся более 200 различных заболеваний, в пределах которых по фенотипическим проявлениям выделяют отдельные группы: (1) заболевания, приводящие к нарушениям ороговения (ихтиозы, кератозы и кератодермии); (2) заболевания, при которых нарушена пигментация (гипо- и гиперпигментация); (3) заболевания, обусловленные дефектами в системе репарации ДНК (пигментная ксеродерма, синдром Вернера); (4) буллезные генодерматозы (группа ВБЭ); и (5) генодерматозы соединительной ткани.

Установлены корреляции между генотипом многих генодерматозов и фенотипическими и клиническими проявлениями заболевания (рис. 1). С мутациями кератинов, обширного семейства белков, образующих промежуточные филаменты, связаны нарушения прочности, пролиферации и дифференцировки эпидермиса. В зависимости от гена, мутации в котором вызывают заболевание, и локализации мутации возможно образование внутриклеточных агрегатов тонофиламентов и нарушение связи тонофиламентов с десмосома-

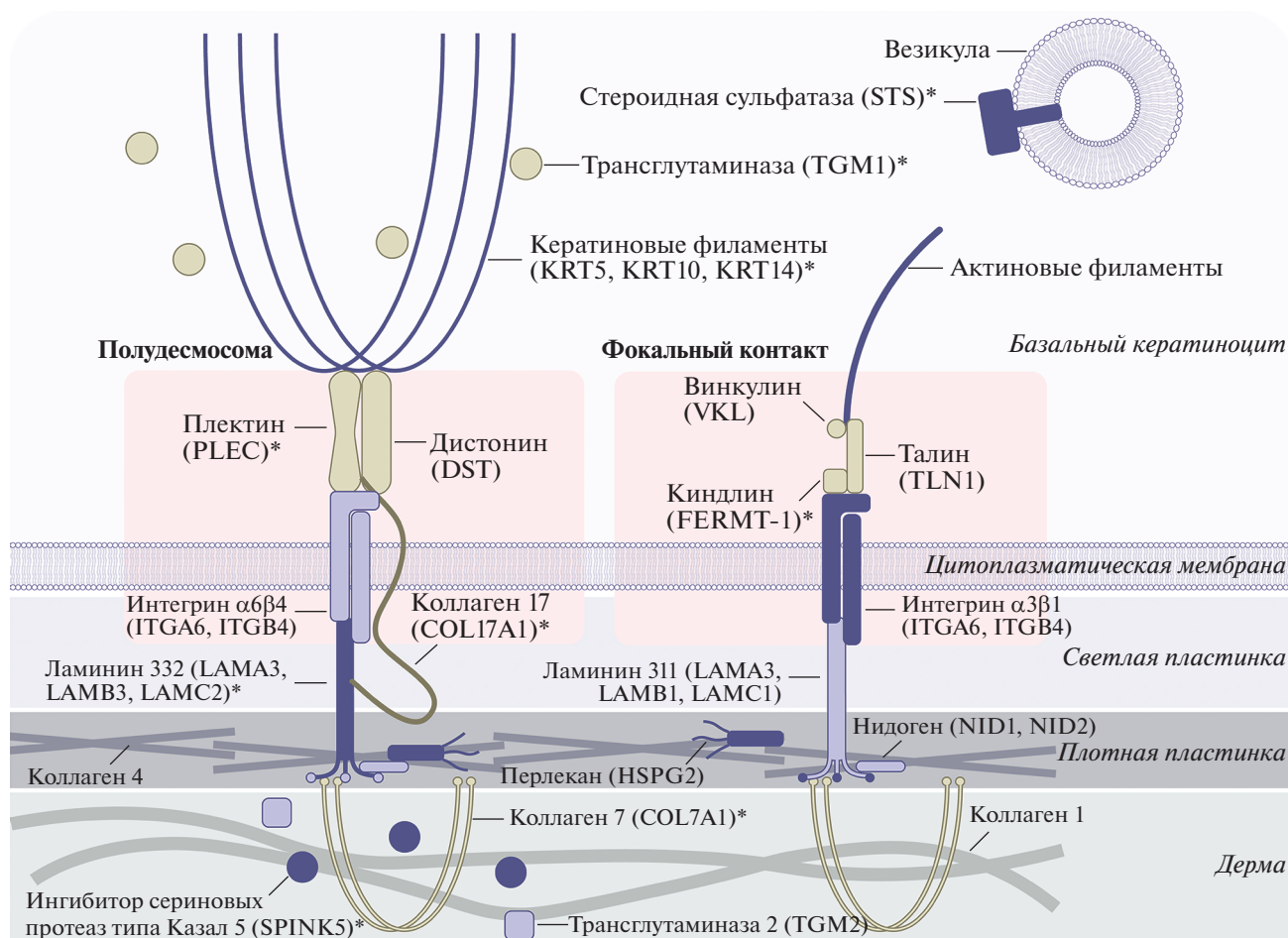


Рис. 1. Схема кератиноцита базального слоя эпидермиса и внеклеточного матрикса с указанием белков, нарушения функций которых вызывают генодерматозы. Причиной генодерматозов являются мутации в генах, кодирующих белки кожи. Чаще всего это структурные белки либо взаимодействующие с ними белки. Звездочками обозначены белки, к генам которых применены методы генотерапии.

ми [1, 7]. Нарушения функции плектина (PLEC, важный линкерный белок, обеспечивающий связь промежуточных филаментов с полудесмосомами) приводят к возникновению синдромных форм поясно-конечностной мышечной дистрофии. Нарушения экспрессии плектина или трансмембранного белка $\alpha\beta4$ -интегрин (ITGA6, ITGB4) приводят к развитию синдромной формы БЭ с врожденной атрезией привратника. При генодерматозах возможны нарушения пигментации кожи, страдает эпителий слизистых оболочек, кожные придатки. За соединение базального слоя эпидермиса с дермой отвечает зона базальной мембраны. Нарушение белков зоны базальной мембраны, например, гетеротримерного ламинина 332 и COL17A1, приводит к разобщению плазматической мембраны базальных кератиноцитов и базальной мембраны, поражению базальной мембраны в области *lamina lucida*. Наконец, нарушения в самом нижнем слое кожи (коллаген

VII) затрагивают зону дермоэпидермального соединения под *lamina densa*.

ВБЭ относится именно к такой сильно гетерогенной группе генодерматозов, объединенных таким свойством, как хрупкость кожи. Эффективные лекарства от ВБЭ в настоящее время отсутствуют, в клинике активно применяются методы паллиативной медицины – средства местного воздействия, направленные на заживление эрозий и язв со смягчающим и защитным действием, а также противовоспалительные средства [7]. Наблюдения клиницистов-дерматологов свидетельствуют о более легком течении болезни при локализованной форме простого (БЭП) или при доминантном дистрофическом ВБЭ (ДДБЭ) [7–9]. Больные с пограничной формой (ПоБЭ), тяжелой генерализованной формой БЭП и рецессивным дистрофическим ВБЭ (РДБЭ) испытывают постоянную боль и зуд в коже, в ответ на минимальную внешнюю нагрузку появляются волдыри и эрозии, которые имеют распространенный

характер. Однако клинические проявления ВБЭ в пределах группы сильно различаются. Локализация поражений в коже зависит от расположения в ней измененного белка (рис. 1). Известно четыре основных группы ВБЭ, три из которых выделяют в зависимости от уровня расщеплений в коже: БЭП проявляется в базальном слое эпидермиса, ПоБЭ – в зоне базальной мембраны, ДБЭ – на уровне якорных фибрилл, связывающих дерму с эпидермисом. На тяжесть клинических проявлений влияет положение мутации в гене, при этом на клинические проявления и течение БЭП и ПоБЭ влияет то, в каком гене произошла мутация [8]. При большом разнообразии мутаций, вызывающих конкретные наследственные заболевания кожи, важным представляется выявление корреляции между генотипом и клиническими особенностями заболевания [10].

Из 560 уникальных генодерматозов (имеющих уникальную запись OMIM) 543 связаны с известными белками (с идентификационным номером (GI, GenInfo Identifier)); остальные 17 связаны с локусами, кодирующими белки с неустановленными GI. Около 85% генодерматозов относятся к моногенным заболеваниям, в основе 9% лежат нарушения в двух генах, а примерно 4% содержат мутации в трех и более разных генах [10]. По данным этих исследований среди всех генодерматозов с установленным наследованием 46% являются аутосомно-рецессивными, а 37% имеют аутосомно-доминантный характер. Ассоциированные с X-хромосомой рецессивно и доминантно наследуемые генодерматозы составляют 4.2 и 1.9% всех генодерматозов соответственно.

ДИАГНОСТИКА ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Генодерматозы диагностируют с помощью иммуногистохимических методов (антигенное картирование) [11, 12]. Более полный анализ патоморфологических изменений и определение их локализации проводят с помощью просвечивающей электронной микроскопии срезов биоптатов кожи [13, 14]. Для патогистологической характеристики можно использовать методы нелинейной оптической микроскопии [15].

Например, применение метода генерации второй гармоники (от англ. Second-Harmonic Generation) и двухфотонного возбуждения флуоресценции (от англ. Two-Photon absorption Fluorescence) позволило выявить нарушения при эпидермолитическом ихтиозе [16]. Такой анализ основан на выявлении структурных изменений коллагенов и кератинов, что позволяет проводить точную диагностику. Определить тип ВБЭ помогает изучение ультраструктуры областей дермоэпидермального соединения, зоны светлой пластинки базальной мембраны, гемидесмосом и других особенностей эпидермиса с помощью просвечи-

вающей электронной микроскопии. В биоптатах кожи пациентов с ВБЭ определенные структуры (якорные фибриллы или компоненты базальной мембраны) либо не детектируются, либо их количество снижено, что приводит к расщеплению слоев, образованию пузырей и эрозий в различных слоях кожи в зависимости от типа ВБЭ [8]. В связи с быстрым развитием технологий высокопроизводительного секвенирования диагностика ВБЭ также переходит постепенно на платформы полноэкзомного секвенирования и секвенирования генов из группы риска, которых в настоящее время насчитывается чуть более 20 [17].

ДОМИНАНТНО И РЕЦЕССИВНО НАСЛЕДУЕМЫЕ МУТАЦИИ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТНЫЕ ПАТОЛОГИИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Кратко рассмотрим типы наследования патологических мутаций, вызывающих генодерматозы.

1. Среди доминантно-негативных мутаций наиболее распространены мутации, вызывающие кератинопатию. К кератинопатиям относится группа заболеваний, включающая ВБЭ простого типа (БЭП), эпидермолитический ихтиоз, врожденная пахионихия, при которых нарушаются функции кератинов, экспрессирующихся специфически в разных эпидермальных слоях кожи. Аутосомно-доминантные мутации в генах *KRT5*, *KRT14*, *KRT1*, *KRT10*, *KRT6A*, *KRT6B*, *KRT6C*, *KRT16*, *KRT17* приводят к появлению того или иного генодерматоза, проявляющегося хрупкостью эпидермиса, появлением пузырей, цитолизом и гиперкератозом [18, 19]. Генотип пробанда может содержать гетерозиготные миссенс-мутации или небольшие инсерции и делеции, которые пациенты либо унаследовали от родителей по доминантному типу, либо приобрели *de novo*. Так, около 30% случаев врожденной пахионихии вызваны *de novo* мутациями [20].

2. Мутации аутосомно-доминантного типа обнаруживаются также при ДБЭ. Выделяют два типа ДБЭ: аутосомно-доминантный (ДДБЭ) и аутосомно-рецессивный БЭ (РДБЭ). По данным 2011 года РДБЭ встречается, в 4 раза чаще, чем ДДБЭ [21]. Оба типа ДБЭ возникают в результате мутаций в гене *COL7A1*, большая часть мутаций ДДБЭ – это миссенс-мутации в кодирующих глицин кодонах в повторяющихся триадах Gly-X-Y C7 [22].

3. ВБЭ пограничного типа (ПоБЭ) вызывается аутосомно-рецессивными мутациями. Наиболее тяжелую форму Герлица вызывают патологические мутации в гене *LAMB3*, кодирующем один из мономеров гетеротримерного белка ламинина 332, важного компонента комплекса белков базальной мембраны (рис. 1). Причиной ПоБЭ могут быть

также мутации в генах, кодирующих коллаген XVII (COL17) и $\alpha 6\beta 4$ -интегрины (ITGR $\alpha 6\beta 4$).

РДБЭ – наиболее сложный инвалидизирующий подтип ВБЭ, при котором затронуты не только кожные покровы, но и эпителиальная выстилка внутренних органов, во многих тканях развиваются фибротические изменения, страдает зрение, отмечается ранняя смертность вследствие развития плоскоклеточного рака кожи. При РДБЭ находят миссенс-, нонсенс-мутации и мутации, нарушающие сплайсинг гена *COL7A1*. При РДБЭ возможно как снижение количества коллагена VII (C7), так и полное отсутствие этого белка [23]. В табл. 1 перечислены некоторые генодерматозы, указаны гены и патологические мутации, а также характер их наследования.

3. Среди всех патогенных мутаций в *COL7A1* (в нем насчитывают более 800 различных мутаций) примерно 34% занимают нонсенс-мутации, прерывающие рамку считывания *COL7A1* и приводящие к появлению преждевременных стоп-кодонов [35]. Преждевременные стоп-кодона появляются либо непосредственно (нонсенс-мутации), либо вследствие мутаций, нарушающих сплайсинг.

В клетках эукариот существует специальный механизм деградации транскриптов с преждевременными стоп-кодонами (NMD, Nonsense Mediated Decay). Эффективность деградации зависит от локализации этих стоп-кодонов в экзоне и длины фрагмента между стоп-кодоном и ближайшим сайтом сплайсинга, т.е. местом соединения экзонов [36]. NMD является причиной функционального нарушения при многих известных генетических болезнях, так как деградация мРНК приводит к нехватке или отсутствию функционального белка [37]. При этом возможен и обратный вариант, при котором в результате NMD снижается количество частично функционального укороченного белка, как в случае мышечной дистрофии Дюшенна [38]. Встречаются и другие варианты с противоположным эффектом, когда отсутствие NMD приводит к синтезу укороченного и/или токсичного для клетки белка [37–39]. В этом случае активация каскада может привести к улучшению фенотипа. Суммируя, можно выделить группу заболеваний, при которых активация NMD приводит к ухудшению функциональных проявлений в клетках; и группу, в которой NMD снижает проявления патологической мутации [37].

Редактирование генома может привести к изменению рамки считывания мутантного аллеля, появлению NMD и потере доминантно-негативного эффекта мутации. Возможен противоположный вариант, когда патологическое действие мутации заключается в деградации по механизму NMD и потере функции, вызванной нехваткой белка. В результате редактирования деградация прекращается за счет изменения рамки считыва-

ния. Таким образом, возникновение NMD в результате мутации чаще имеет негативные последствия при рецессивно-наследуемых формах генодерматозов, тогда как снижение NMD может приводить к восстановлению функции гена. В случае доминантно-негативных мутаций манипулирование активацией NMD за счет встраивания инсерций и делеций (инделей) в мутантный аллель может восстановить поврежденную функцию в клетке.

МЕТОДЫ ТЕРАПИИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ И ИХ РАЗВИТИЕ

До появления методов геномного редактирования разрабатывались методы клеточной и генной терапии генодерматозов *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, описаны попытки посттранскрипционного воздействия на мРНК генов с известными мутациями, вызывающими генодерматозы: это прежде всего применение малых молекул, влияющих на эффективность трансляции мРНК с преждевременными стоп-кодонами, например, амплексанокса или гентамицина, воздействие на сплайсинг пре-мРНК с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и использование механизма транс-сплайсинга [8, 39]. Однако необходимость постоянного введения в клетки терапевтического агента и относительно невысокая эффективность этих методов ограничивают их применение.

Развитие методов генетической коррекции и клеточной терапии генодерматозов

В начале 2000 годов начались поиски подходов к генетической коррекции генодерматозов, прежде всего мутаций гена *COL7A1*, без использования вирусных платформ доставки, с помощью интеграции космидных ДНК, микроинъекций плазмид PAC (на основе искусственных хромосом из P1) в культуры клеток пациентов с РДБЭ и в трансгенных мышей [40, 41]. Затем в развитии генных и клеточных технологий все большее место стали занимать вирусные методы доставки. При некоторых наследственных заболеваниях кожи успешно применяли вирусную трансдукцию генотерапевтическими кассетами. Это, прежде всего, пигментная ксеродерма [26, 27], врожденный ихтиоз, ассоциированный с X-хромосомой [24], синдром Нидертона [42], ПоБЭ [25, 33] и РДБЭ [5, 43, 44] (табл. 1). Как правило, использовали ретровирусные системы доставки генотерапевтической кассеты [45], но применяли также векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), например, в случае *LAMA3* [46] и *SPINK5* [47] (рис. 1). Доставка трансгенных последовательностей с помощью векторов на основе AAV оказалась очень эффективной, но ограниченный размер вставки, встраиваемой при использовании таких векто-

Таблица 1. Генодерматозы, их фенотипические проявления и генетические основы, методы генетической коррекции

Генодерматоз	Фенотипические проявления	Характер наследуемости	Ген	Метод редактирования	OMIM	Ссылка
X-ассоциированный ихтиоз	Нарушения процессов ороговения; нарушения обмена стероидов	XP	STS	Ретровирусная генотерапия	308 100	[24]
Эпидермолитический ихтиоз	Акантокератолитический гиперкератоз**	АД	KRT10	Нокаут гена	607 602	[25]
Пигментная ксеродерма	Нарушения пигментации сопровождаются патологическим ороговением, атрофией, дистрофией ткани, атипией и ранним развитием опухолей	АР	XPC	Ретровирусная генотерапия	278 720	[26, 27]
Врожденный ламеллярный ихтиоз	Гиперкератоз, гиперплазия базального слоя эпидермиса	АР	TGM1	Редакторы оснований	242 300	[28]
Синдром Нидертон*	Нарушение ороговения в эпидермисе; аллергия, нарушения иммунной системы	АР	SPINK5	Нокаут гена CRISPR/Cas9 HDR	256 500	[29]
Врожденный буллезный эпидермолиз						
Буллезный эпидермолиз простого типа	Пузыри в базальном слое эпидермиса не оставляют рубцов, при стрессе клеток происходит агрегация цитокератиновой сети	АД	KRT14, KRT5	CRISPR/Cas9 HR; TALEN HDR	131 900	[30–32]
Буллезный эпидермолиз пограничного типа	Появление пузырей и эрозий без травм, образование грануляционной ткани	АР	COL17 LAMA3 LAMB3 LAMC2 ITGA6, ITGB4	Ретровирусная генотерапия; CRISPR/Cas9 HR	226 650	[33]
Буллезный эпидермолиз дистрофического типа	Пузыри и эрозии глубокого залегания в коже, заживают атрофическими рубцами, милии, сращения, образование агрессивных карцином	АР АД	COL7A1	CRISPR/Cas9 HR; CRISPR/Cas9 HDR TALEN HR	226 600	[34]
Синдром Киндлер	Пузыри и рубцевание с формированием контрактур, псевдосиндактилии	АР	FERMT1	Нет	173 650	[7]

* Термин синдром подразумевает мультиорганную патофизиологию, т.е. наличие иных, не только кожных повреждений.

** Гиперкератоз акантолитический – нарушение дифференцировки кератиноцитов, приводящее к вакуолизации, утолщению и образованию пузырей в верхнем слое эпидермиса.

Примечание. АД – аутосомно доминантный; АР – аутосомно рецессивный; XP – ассоциированный с X-хромосомой, рецессивный.

ров, делает этот метод недоступным для ряда генов. Основной популяцией клеток при редактировании упомянутых выше генов были эпидермальные кератиноциты (для *ex vivo* протоколов терапии). Оказалось, что для достижения длительного терапевтического эффекта от примене-

ния генной терапии важна не только эффективная трансдукция клеток, но и оптимальные условия культивирования первичных кератиноцитов. Среди первичных кератиноцитов базального слоя эпидермиса есть стволовые эпидермальные кератиноциты, так называемые голо-клоны [33]. Гене-

тическая модификация именно этой популяции обеспечивает длительное действие трансгенного эпидермиса после аутологичной трансплантации. Если культивируемые клетки подверглись стрессу и/или репликативному старению, то приготовленные на их основе графты не окажут терапевтического эффекта [31].

Для клеточной терапии РДБЭ используют дермальные фибробласты и эпидермальные кератиноциты, поскольку и фибробласты, и кератиноциты секретируют С7. Аутологичная трансплантация в большинстве случаев приводит к временному повышению содержания С7 в коже в области дермо-эпидермального соединения. Однако временный и местный характер терапии и риск осложнений от аллогенной трансплантации делают необходимым поиск других подходов. Так, в течение нескольких лет проходят клинические исследования эффективности интрадермальных инъекций ген-модифицированных аутологичных фибробластов у пациентов с РДБЭ (NCT02493816) [48]. Опубликованы результаты клинических исследований и 5-летнего наблюдения ребенка с тяжелой формой ПоБЭ, перенесшего аутологичную трансплантацию трансгенного эпидермиса [2, 33]. Наибольшее количество методов генотерапии заболеваний кожи предполагает проведение генетической коррекции *ex vivo* на пациент-специфичных кератиноцитах, фибробластах и стволовых клетках [34, 49, 50]. Протоколы генетической коррекции *ex vivo* включают несколько стадий: культивирование клеток, выделенных из образцов ткани, полученных при биопсии; проведение генетической коррекции (вирусная трансдукция; редактирование геномов с помощью программируемых нуклеаз); наращивание генетически модифицированных клеток по безопасным протоколам GMP; обширный анализ и проверка функциональной безопасности редактирования; ксенотрансплантация клеток мышам с иммунодефицитом и оценка экспрессии маркеров дифференцировки; трансплантация клеточных пластов (графтов) пациенту. Альтернативно развивается стратегия генетической коррекции *in vivo*, когда пациенту интрадермально вводят суспензию вирусных частиц с функциональной копией гена. К методам генотерапии, применяемым *in vivo*, относятся электропорация и внутривенное введение системы CRISPR/Cas9, которые в настоящее время применяют только в доклинических исследованиях [51]. Недавно американская компания “Krystal Biotech” запатентовала для *in vivo* применения новое генотерапевтическое средство В-VEC на основе рекомбинантного вируса простого герпеса (HSV1), содержащего две копии кодирующей области гена *COL7A1*. Начались клинические испытания (фазы 1 и 2) препарата В-VEC на пациентах с РДБЭ [52]. В-VEC применили, в частности, в терапии нарушений роговицы у больных с РДБЭ

[4]. Учитывая мультисистемный характер нарушений при целом ряде генодерматозов, разработка новых методов терапии и совершенствование методов доставки терапевтических агентов приобретает особое значение в случае заболеваний, считавшихся неизлечимыми.

Обратный мозаицизм

В процессе изучения ВБЭ обнаружили феномен, названный обратным мозаицизмом. На коже пациента впервые были найдены зоны самопроизвольного восстановления целостности эпидермиса, которые оказались результатом возникновения в этих зонах второй мутации, компенсирующей воздействие первой патологической мутации. Обратный мозаицизм обнаружен при всех формах ВБЭ, за исключением синдрома Киндлер [53, 54]. Сообщается о нескольких зонах, содержащих до пяти различных мутаций разных локализаций, на теле пациентов с ВБЭ [55]. Обратный мозаицизм найден примерно у 36% пациентов с РДБЭ. Кроме того, у пациентов с РДБЭ обнаружены дермальные фибробласты с обратным мозаицизмом [56]. Впервые появились перспективы аутологичной трансплантации: первичные клетки из зон с мозаицизмом, культивируемые *in vitro*, рассматривали как биомедицинский продукт, перспективный для аутологичной трансплантации. Результаты применения этого подхода оказались весьма скромными и, если в случае ПоБЭ они улучшили состояние пациентов, то при РДБЭ эффект полностью отсутствовал. Терапевтический потенциал клеток из зон с обратным мозаицизмом оказался ограниченным, по-видимому, за счет снижения пролиферативной активности мозаичных клеток. Получение иПСК из кератиноцитов из зон мозаицизма, например при РДБЭ, стало одним из первых перспективных методов персонализированной медицины, получивших развитие до начала широкого применения методов редактирования генома [57].

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток

Наравне с редактированием генома разрабатывается альтернативный терапевтический подход — аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток костного мозга от донора, полностью совместимого по HLA (Human Leukocyte Antigens). Показано, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга направленно мигрируют в зоны воспаления на коже [58]. В частности, после успешного доклинического испытания ксенотрансплантации на мышах начались клинические испытания такого подхода к терапии ВБЭ и РДБЭ, как наиболее тяжелой формы ВБЭ [59]. В настоящее время совершенствуется использование алло-

генной трансплантации гемопоэтических клеток костного мозга и мезенхимальных стволовых клеток пациентам с РДБЭ после проведения химиотерапии [60, 61]. Отмечены смертельные исходы, обусловленные развитием иммунной реакции трансплантат против хозяина и высокой токсичностью проводимой химиотерапии. Сообщается об успешных клинических испытаниях (NCT02582775) на 10 пациентах, которым проводили аллогенную трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток в сочетании с введением циклофосфида для обеспечения иммунной толерантности [62, 63]. Сочетание методов аллогенной трансплантации с редактированием генома может создать реальную перспективу терапии этого сложного генетического заболевания.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки и их репрограммирование в клетки разных типов

Развитие технологии получения iPСК из пациент-специфичных клеток увеличило возможности и перспективы новых методов функциональной терапии [64]. Разработка протоколов “дифференцировки” iPСК, т.е. их репрограммирование в клетки разного типа, имеет принципиальное значение. Естественный репликативный предел первичных соматических клеток (предел Хейфлика) ограничивает возможности их использования после генетической коррекции. Особенно это касается тех случаев, когда биоптат пациента содержит мало эпидермальных стволовых клеток, как бывает, например, при РДБЭ. Получение изогенных iPСК и редактирование генома с последующим репрограммированием в изогенные клетки, фибробласты, кератиноциты и гемопоэтические клетки потенциально позволяет убрать эти ограничения. Методы репрограммирования в разные типы клеток не всегда просты, но постоянно совершенствуются [65]. Перспективы использования iPСК для редактирования генома подчеркиваются в контексте генотерапии ВБЭ, особенно дистрофического типа при РДБЭ [34, 66]. Синдромные проявления генодерматоза или наличие тяжелых генерализованных форм, когда страдают не только кожа, но и слизистые оболочки внутренних органов, а также роговица и конъюнктивы глаз, диктуют необходимость генотерапевтического подхода на уровне стволовых клеток. В 2011 году были опубликованы результаты первого опыта прямого репрограммирования iPСК, специфичных для РДБЭ, в кератиноциты и фибробласты [67]. В этой работе впервые для ВБЭ получены 3D модели эпидермиса и искусственные эквиваленты кожи, содержащие кератиноциты и фибробласты, репрограммированные из iPСК. После ксенотрансплантации искусственных эквивалентов кожи мышам SCID/NOD и за-

растания раны проводили иммуногистохимический анализ маркеров экспрессии. С помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа выявили различия в уровне экспрессии секреторного белка С7 в эквивалентах, несущих РДБЭ-специфичные клетки, и в образцах клеток, полученных от здоровых доноров. Предшественник белка С7 подвергается посттрансляционным модификациям, отщеплению N- и C-концевых частей, антипараллельной димеризации, а потом тримеризации. В результате этих модификаций образуются отдельные морфологические структуры – якорные фибриллы, связывающие дерму с эпидермисом. Якорные фибриллы хорошо детектируются с помощью трансмиссионной электронной микроскопии [63]. При РДБЭ мутации в гене *COL7A1*, кодирующем С7, приводят к дефициту или полному отсутствию якорных фибрилл. Таким же способом с помощью функционального иммуногистохимического анализа оценивают эффективность восстановления экспрессии целевого гена в клетках после редактирования генома.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Пути репарации внесенных в ДНК одноцепочечных и двухцепочечных разрывов

Методология редактирования генома тесно связана с выбором и активацией пути репарации ДНК после внесения в нее разрывов программируемыми нуклеазами. Выявление ключевых факторов, регулирующих репарацию, важно для понимания механизмов процесса и возможности манипулировать ими по ходу редактирования генома.

Одноцепочечные разрывы возникают в клетке постоянно, их быстрая репарация, превращение в двухцепочечные (ДЦР) и процессирование регулирует репликативный стресс клетки, предотвращает ее преждевременное старение и гибель, а также блокирует возможную онкотрансформацию. В клетках млекопитающих существуют два основных пути репарации разрывов ДНК: канонический путь негомологичного соединения концов (с-NHEJ, от англ. canonical nonhomology end-joining) и направляемая гомологией репарация (HDR). HDR происходит путем гомологичной рекомбинации с участием другой молекулы ДНК. Важную роль в репарации ДНК играют киназы, подобные фосфатидилинозитол-3-киназам (ATM, ATR, DNA-PKcs) [68]. Помимо репарации, в которой ключевая роль отводится ATM и DNA-PK, все три киназы участвуют в регуляции клеточного цикла, в частности, ATM активирует киназы контрольных точек репликации (check point kinases). ATM вовлечена в регуляцию прохождения клеточного цикла, активация ATR приводит к репликативному стрессу и остановке клеточного

цикла [69]. Активность двух других треонин-сериновых протеинкиназ важна для репарации ДЦР: АТМ участвует в регуляции клеточного цикла, DNK-ПК – в регуляции репликативного стресса. Аутофосфорилирование каталитической субъединицы DNA-ПК, происходящее в области повреждения ДНК в присутствии Ku-полимераза, приводит к активации всего холофермента, стимулирующего активность эндонуклеазы Artemis к процессированию разрывов ДНК [70]. Показано, что аутофосфорилирование DNA-ПК запускает с-NHEJ [69]. Для правильного прохождения репарации важен процесс фосфорилирования гистона γ H2AX и белка-медиатора контрольной точки репликации 1 (MDK1). Последующая активация и привлечение E3 убиквитинлигаз к гистону H2A создают в области ДЦР удобную платформу для привлечения факторов, участвующих в каскадах, идущих по пути, опосредованному либо 53BP1, либо BRCA1. В HDR участвуют 53BP1, полимераза Ku и ДНК-лигаза 4, которая напрямую лигирует два конца ДНК [71]. Путь с-NHEJ наиболее активен в основных фазах клеточного цикла (кроме S и частично G2). Благодаря активности с-NHEJ происходит образование инсерций и делеций в сайте специфического разрезания при редактировании генома. На линиях клеток человека с помощью интеграции флуоресцентных репортеров в хромосомы показано, что с-NHEJ активируется через 30 мин после образования разрывов в ДНК и отвечает за 75% всех репаративных процессов [72].

Баланс активности и содержания ряда регуляторных факторов, киназ, ДНК-связывающих белков, нуклеаз и полимераз определяет, по какому пути пойдет репарация в клетке, например, активность комплекса MRN (MRE11-RAD50-NBS1), за активацию которого отвечает комплекс Sae2/CtIP, сдвигает равновесие в сторону гомологичной рекомбинации [73]. Баланс факторов CtIP и MRE11 влияет на эффективность процесса резекции концов ДНК в области ДЦР. Защита ДЦР, регулируемая при поддержке факторов WRN и RECQ, позволяет клетке избежать возникновения больших делеций и слипания концов хромосом [74]. Для начала гомологичной рекомбинации важен процесс резекции 5'-концов, т.е. образование одноцепочечных 3'-концов, субстратов RAD51. Для резекции концов после первой стадии активации комплекса MRN важна вторая стадия – получение 3'-выступающих концов, протекающая за счет активации экзонуклеаз Exo1 и Dna2. HDR, в отличие от всех остальных процессов, это единственный механизм, обеспечивающий точное восстановление репаруемой матрицы. Важным фактором, обеспечивающим сохранение исходной последовательности в ДНК, является встраивание гомологичной ДНК, используемой в качестве матрицы, это может

быть сестринская хроматида или экзогенная донорная ДНК [72]. Для процесса HDR важна активность таких факторов, как BRCA2, PALB2 и RAD51, и снижение активности 53BP1. Негативная роль 53BP1 в HDR подтверждается тем, что доминантно-негативный мутант 53BP1, слитый с белком Cas9, снижает с-NHEJ и увеличивает эффективность HDR в клетках различного типа [75]. Использование механизмов HDR позволяет исправлять точечные мутации и вводить более длинные последовательности, например, флуоресцентные репортеры или гены устойчивости к антибиотикам. При редактировании геномов часто используется подход, связанный с введением в рекомбинантные донорные последовательности loxP-повторов, позволяющих проводить отбор прошедших рекомбинацию клонов, а затем с помощью сайт-направленной Cre-рекомбинации элиминировать из генома экзогенные кассеты [34, 76].

Программируемые нуклеазы

В генотерапии с применением редактирования генома используются в основном программируемые нуклеазы на основе открытых ранее доменов TALEN и систем CRISPR/Cas (применяемых в настоящее время). TALEN – это химерные белки, которые состоят из нуклеазного домена FokI и ДНК-связывающего TALE-домена – транскрипционного фактора, полученного из растительного патогена *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен состоит из tandemно расположенных повторов из 35 аминокислотных остатков, при этом каждый повтор узнает только один нуклеотид в большой бороздке ДНК. Таким образом набор TALE-доменов узнает уникальную последовательность ДНК длиной 20 п.н. Эта синтетическая система способна специфически узнавать любую последовательность ДНК. До изобретения системы CRISPR/Cas9 основные надежды на развитие методов редактирования геномов связывали с доменами TALEN. К недостаткам TALEN-доменов следует отнести трудоемкость и сложность их клонирования. При необходимости изменения последовательности для редактирования нужно полностью изменить дизайн TALE и клонировать *de novo* всю химерную молекулу TALEN.

В отличие от белков TALEN действие системы CRISPR/Cas направляется некодирующей РНК. CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами и разделенные уникальными последовательностями (спейсерами). Специфичность разрезания чужеродной ДНК нуклеазой Cas определяется короткими некодирующими РНК, узнающими и связывающими последовательность ДНК-мишени. В названии CRISPR/Cas отражено прокариотическое

происхождение этой системы, являющейся частью иммунной системы прокариот. Самое широкое применение на сегодня имеет белок Cas9 (или spCas9, выделенный из *Streptococcus pyogenes*), CRISPR/Cas9 относится ко второму типу систем, в которых участки CRISPR процессируются и в соединении с транс-активирующей РНК crRNA (tracrRNA) образуют так называемую направляющую РНК (sgRNA, англ. single guide RNA), которая комплементарно связывается с целевым фрагментом ДНК, узнавая таким образом ДНК-мишень. Связавшись с ДНК, эти РНК взаимодействуют с Cas9, конформация которой изменяется, после чего фермент начинает специфично вносить ДЦР в ДНК [77]. Для функционирования системы необходим трехнуклеотидный PAM-мотив в ДНК (PAM – Protospacer Adjacent Motive – прилегающий к протоспейсеру мотив, имеющий структуру 5'-NGG-3', где N – любой нуклеотид). PAM должен прилегать непосредственно к участку узнавания направляющей РНК. Активированная Cas9 разрезает ДНК примерно в 4 п.н. от PAM, образуя ДЦР. Таким образом, система CRISPR/Cas9 не требует дизайна *de novo* белка для узнавания каждой новой мишени. Необходимо лишь подобрать последовательность спейсера, содержащую PAM, и синтезировать специфическую направляющую РНК. Дизайн направляющей РНК может быть осуществлен с помощью различных биоинформатических ресурсов, например, benchling (benchling.com) или CRISPRESSO (crispor.tefor.net). При этом следует обратить внимание не только на предсказанную активность направляющей РНК, но и на ее способность к неспецифической активности (Off Target activity). Неспецифическая активность существенно затрудняет проведение эксперимента при редактировании генов, кодирующих повторяющиеся домены (например, в коллагенах) или высоко консервативные белки (такие, как кератины). Как правило, все целевые клоны после редактирования должны подвергаться широкомасштабному секвенированию, чтобы выявить возможную неспецифическую активность программируемой нуклеазы.

Кроме собственно Cas9, при редактировании генома используют разные мутантные варианты этого белка: Cas9n D10A [32]; BE-HF1,2,4; FokI-dCas9; espCas9 [78]; а также другие системы, например, Cpf1 (CRISPR/Cas12, asCas12 система V-типа, выделенная из *S. aureus*), специфичные к другой последовательности PAM. Опубликованный недавно новый вариант Cas12 – Cas12f1, модифицированный из фермента архей Un1Cas12f1, обладает большей эффективностью и специфичностью, чем asCas12a, имеет меньший размер, позволяющий использовать AAV (AAV2) для доставки системы Cas12f1 в эукариотические клетки [79]. С помощью этой нуклеазы проведено эффективное

редактирование точечных патологических мутаций, в частности, в гене *KRT1* [79].

Типы мутаций и их нуклеотидное окружение как контекст, определяющий выбор стратегии редактирования генома

Выбор стратегии редактирования генома в большой степени зависит от того, каким путем должна идти репарация ДНК для устранения мутации. В основном это выбор между HDR и c-NHEJ. Предпочтительность HDR обусловлена высокой точностью редактирования мутаций, хотя основным фактором выбора пути является генетический контекст: доминантный/рецессивный статус мутации ее локальное нуклеотидное окружение [30, 77].

Во-первых, c-NHEJ можно применять для нокаута мутантного аллеля доминантного типа. С этой целью можно использовать направляющую РНК, которая специфически отжигается на нуклеотидной последовательности гена непосредственно приближенной к мутации (рис. 2а). Этот подход позволяет восстановить рамку считывания, нарушенную мутацией – к восстановлению рамки считывания могут привести инсерции или делеции, возникающие в процессе репарации. Однако репарация чаще приводит к появлению преждевременного стоп-кодона, нарушающего рамку считывания, что важно, например, при коррекции мутации доминантного типа в *COL7A1* [81]. Из библиотеки клонов, содержащих инсерции или делеции в этой области, выбирают те, в которых произошло восстановление рамки считывания *COL7A1*. Важное значение в выборе метода редактирования (в том числе дизайна эффективных направляющих РНК) имеет нуклеотидное окружение мутации, в частности, возможность подбора такой направляющей РНК, применение которой при редактировании мутации доминантного типа приведет к образованию преждевременных стоп-кодонов [82]. Во-вторых, c-NHEJ можно использовать для нарушения сплайсинга, т.е. опосредованная CRISPR/Cas9 репарация может привести к вырезанию экзона в неправильной рамке считывания или к “пропуску” экзона (рис. 2б). В-третьих, возможный механизм направленного пропуска одного или нескольких экзонов, при котором используются две разные направляющие РНК, специфические к последовательностям разных экзонов и интронов. В результате, помимо делеции участка, содержащего мутацию, устраняется один или несколько экзонов и восстанавливается рамка считывания. Один и тот же вариант пропуска экзона (экзонов) можно использовать у разных пациентов при разных мутациях, локализованных в данной области. Этот механизм применим только к гену *COL7A1*, имеющему множество экзонов в одной рамке считывания. Примеры ис-

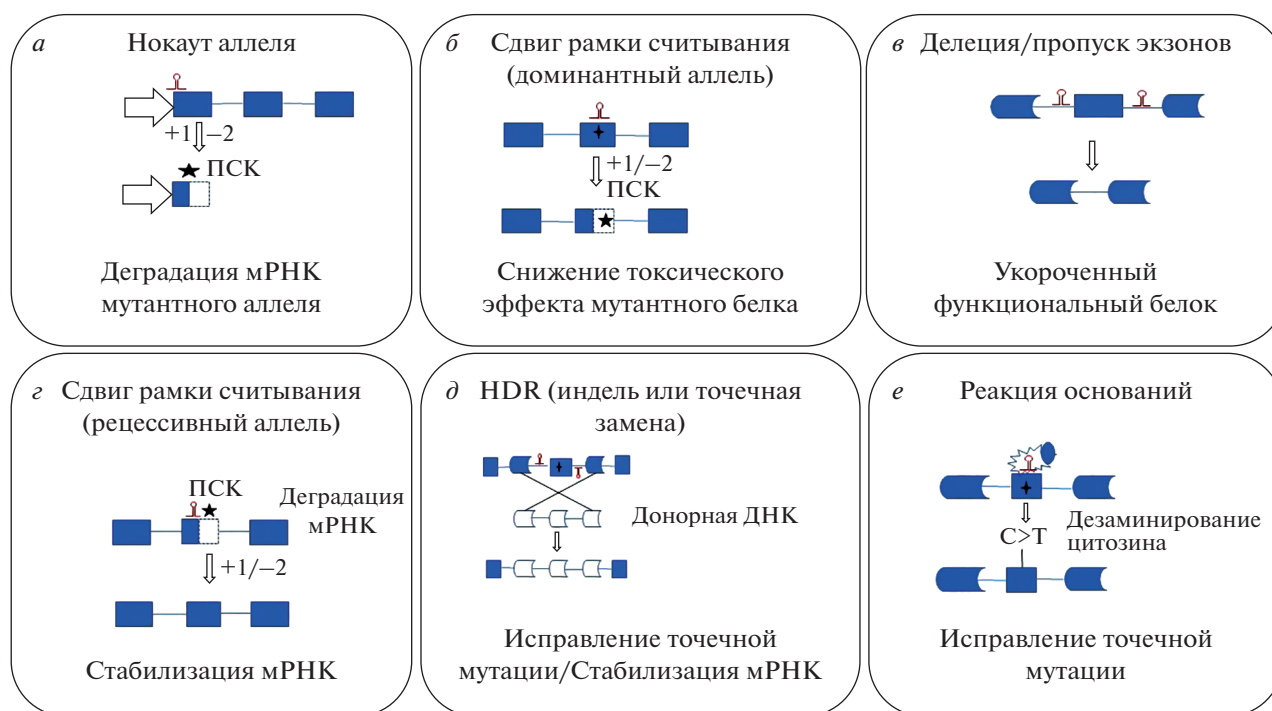



Рис. 2. Стратегии редактирования генома, предлагаемые для развития новых методов генотерапии генодерматозов.

 – направляющая РНК (здесь подразумевается работа системы CRISPR/Cas9). ПСК – преждевременный стоп-кодон, вызывающий в определенных условиях деградацию мРНК. HDR – направляемая гомологией репарация.

пользования некоторых подходов к редактированию геномов приведены на рис. 2. Нокаут, сдвиг рамки считывания, пропуск экзонов – эти методы, применяемые *in vitro* или *in vivo*, могут использоваться при введении компонентов системы CRISPR/Cas в виде РНК-белковых комплексов или плазмид.

Для редактирования гена *COL7A1* и восстановления экспрессии *C7* применяются различные методы. Ген *COL7A1* имеет сложную структуру, он содержит 118 экзонов и множество повторяющихся последовательностей в области коллагенового и фибронектин-подобного доменов. В чем состоят преимущества стратегий геномного редактирования в случае гена *COL7A1*? База мутаций, вызывающих РДБЭ, содержит более 800 различных мутаций. Возможность сайт-специфического дизайна направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 существенно расширяет возможности направленного воздействия на мутацию. Большой размер гена *COL7A1* (31 т.п.н.) не позволяет использовать эффективные системы доставки полноразмерных копий кДНК (например, AAV-векторы) в клетки, но для редактирования генома донорными ДНК могут использоваться разные фрагменты гена, в которые вносят нужные изменения, встраивают кассеты генов для селекции или вносят SNP. Важное значение имеет

сохранение эндогенной регуляции экспрессии гена *COL7A1*, промотор которого содержит регуляторные элементы, связывающие транскрипционные факторы AP-1 и SMAD, стимулирующие активность промотора [85].

В гене *COL7A1* обнаружены многочисленные мутации, однако некоторые из них, например, инсерция с.6527 insC в экзоне 80, чаще других используются для редактирования генома. Эта мутация приводит к появлению преждевременного стоп-кодона и деградации мРНК в результате NMD, она с высокой частотой встречается в европейской популяции больных РДБЭ (найдена примерно у 46% больных РДБЭ в Испании). Описана коррекция с.6527insC с использованием обоих механизмов репарации (с-NHEJ и HDR) [86]. С помощью HDR получены отдельные клоны с восстановленной экспрессией *C7*. Воздействие TALEN на геномную ДНК без донорной последовательности привело к образованию набора делеций и инсерций, при этом в ряде случаев происходил сбой рамки считывания (рис. 2а). В результате удалось найти и отобрать несколько клонов с восстановленной открытой рамкой считывания *COL7A1*. В обоих случаях (после и с-NHEJ, и HDR) у мышей с иммунодефицитом, которым ксенотрансплантировали эпидермальные эквиваленты кожи, полученные после редактирова-

ния генома, выявили синтез *C7* и образование структур, похожих на якорные фибриллы человека. Интересно, что некоторые клетки с продуктом *c-NHEJ* сильнее экспрессировали *C7*, чем клетки, в которых прошла HDR. Нельзя исключить и роль случайного мутагенеза, который может позитивно повлиять на экспрессию или фолдинг белка. Проведено также редактирование этой же мутации с помощью CRISPR/Cas9 [87]. *c-NHEJ* после воздействия Cas9 использовали для изменения открытой рамки считывания гена *COL7A1*, что привело к восстановлению экспрессии *C7* (рис. 2з). Описано эффективное применение РНК-белкового комплекса CRISPR/Cas9 с двумя направляющими РНК при редактировании все той же мутации с использованием *c-NHEJ* [88].

Эпидермолитический ихтиоз, вызываемый мутациями в гене *KRT10*, имеет, как правило, аутомно-доминантное наследование. Белок K10, кодируемый геном *KRT10*, экспрессируется в дифференцированных кератиноцитах супрабазального слоя эпидермиса (табл. 1). Нарушения в структуре K10 приводят к его агрегации в сети промежуточных филаментов в дифференцированных кератиноцитах, цитолизу в верхнем шиповидном и зернистом слое эпидермиса и повышенной чувствительности кератина к тепловому стрессу. В 2018 году March и соавт. применили геномное редактирование с помощью TALEN-доменов для нокаута мутантного аллеля *KRT10* в иммортализованных кератиноцитах пациента с гетерозиготной мутацией *c.1333G >A* [25]. *c-NHEJ* имела высокую эффективность (56.8%) и привела (без дополнительной селекции) к появлению клонов с преждевременными стоп-кодонами в мРНК, несущей мутацию, найденную при эпидермолитическом ихтиозе, и к деградации этой мРНК (рис. 2а). Аберрантная экспрессия K10B в отобранных клетках не обнаружена.

В 2016 году Shinkuma S. и соавт. применили редактирование гена *COL7A1* для нокаута доминантной мутации в экзоне 109, вызывающей ДДБЭ [81]. Секвенирование геномной ДНК из клеток периферической крови пациента с ДДБЭ выявило гетерозиготную мутацию *c.8068_8084delinsGA* в гене *COL7A1* – делецию 17 н. и инсерцию 2 н. В мРНК, считанной с мутантного аллеля, сохранялась открытая рамка считывания *COL7A1*, но ее белковый продукт был укорочен на пять аминокислотных остатков, причем эта делеция затрагивала область Gly-X-Y-повторов коллагенового домена *C7*. Доминантно-негативное действие данной мутации проявлялось в том, что укороченный мутантный белок, участвуя в посттрансляционном процессинге, модификации и тримеризации *C7*, приводил к образованию нефункционального тримера *C7*. Редактирование генома, в данном случае с использованием механизма *c-NHEJ*, с целью репарации ДЦР, привел

к получению набора клонов, в которых мутантный аллель не экспрессировался. В этой работе CRISPR/Cas9-редактирование оказалось в 2–3 раза эффективнее, чем применение TALEN-доменов. Из четырех клонов отобрали один, в котором CRISPR/Cas9-редактирование привело к получению укороченного транскрипта, не подверженного деградации посредством NMD (рис. 2б). После репрограммирования и ПСК в фибробласты проверили экспрессию коллагена типа VII. Образование тримера *C7* оценили с помощью ко-иммунопреципитации мутантных белков *C7*, имеющих FLAG- и HA-таги. Взаимодействие интактного продукта с мутацией *COL7A1* с белком, не содержащим мутаций, сравнивали с взаимодействием продукта из клеток, в которых проведено редактирование *COL7A1*. Фрагмент отредактированного гена, содержащий экзон 109 в другой рамке считывания, приводил к появлению белкового продукта, не участвующего в образовании тримера *C7*. В результате именно данная мутация и сдвиг рамки считывания, полученный после редактирования, восстановили функции *C7* в клетках, изогенных клеткам пациента с ДДБЭ.

Систему CRISPR/Cas9 использовали для редактирования генома клеток с другой рецессивной мутацией в экзоне 70 *COL7A1* – *c.5819delC* (*p.Pro1940Argfs*65*) – с высокой частотой встречающейся у пациентов с РДЭБ в Японии [89]. Изменение рамки считывания в результате *c-NHEJ* привело в этом случае к уничтожению преждевременных стоп-кодонов и появлению транскрипта, не подверженного деградации [90]. Интересно, что для восстановления экспрессии мутантного аллеля *COL7A1* в процессе редактирования не потребовалась донорная ДНК (рис. 2в). Использование направляющей РНК с PAM в области мутации увеличило эффективность редактирования мутантного аллеля.

Редактирование генома в первичных кератиноцитах человека с помощью системы CRISPR/Cas9 позволило создать модель синдрома Нидертонна и применить генную терапию с помощью лентивирусного замещения гена [29]. *c-NHEJ* вызывали в клетках после введения CRISPR/Cas9 и двух направляющих РНК к экзону 1 гена *SPINK5*. В результате получили линию клеток с нокаутом гена *SPINK5* ($\Delta SPINK5$), моделирующего доминантно-негативную мутацию, приводящую к развитию синдрома Нидертонна. Ксенотрансплантация эпидермальных графтов, содержащих генетически модифицированные клетки, мышам с иммунодефицитом привела к появлению фенотипа с гиперкератозом. Трансдукция лентивирусом, несущим рекомбинантный кДНК гена *rvSPINK5* без мутации, клеток с генотипом $\Delta SPINK5$ (без экспрессии белка LEKTI – продукта *SPINK5*) привела к восстановлению экспрессии LEKTI (табл. 1) [29]. Ученые из Австрии и Германии использова-

ли домены TALEN для избирательного нокаута мутантного аллеля гена *KRT5* [31]. Направление нуклеазы на участок последовательности в 5'-области гена привело к нокауту мутантного аллеля (рис. 2а) наравне с аллелем дикого типа. Эффективность нокаута и отбор клеток с инактивированным мутантным аллелем проверяли с помощью прижизненной флуоресцентной локализованной микроскопии. Обнаружены сильные различия в локализации флуоресцентного репортера, экспрессируемого в одной рамке считывания с *KRT5* дикого типа, и с мутантным геном *KRT5*. Мутации, вызывающие БЭП, чаще всего относятся к доминантно-негативным. Устранить такие мутации можно, используя сходный подход, однако всякий раз требуется проверка, поскольку возможно образование укороченных транскриптов, которые избежали действия NMD, но воздействуют на клетку доминантно-негативным образом.

Методы редактирования с использованием репарации, направляемой гомологией (HDR)

HDR для биомедицины. HDR можно применять как к доминантно, так и к рецессивно наследуемым мутациям, что позволяет рассматривать ее как универсальный метод редактирования (рис. 2д). Задача геномного редактирования с помощью HDR в контексте генодерматозов состоит во внесении уникальной точечной мутации в последовательность гена, не затронув при этом ни рамку считывания, ни важные кодирующие или регуляторные области других генов. Изогенные клеточные линии, отличающиеся от исходной первичной линии лишь одним нуклеотидом, служат основой для получения биомедицинского клеточного продукта, пригодного для аутологической трансплантации. В этом продукте восстановлены функции поврежденного белка, при этом он аутологичен клеткам пациента. Однако необходимо также контролировать отсутствие иммунного ответа пациента на новый антиген, продукт генной терапии. Основную проблему представляет крайне низкая эффективность процесса HDR, особенно в первичных клетках. Для биомедицинского применения HDR необходимо повысить эффективность доставки системы редактирования в клетки и разработать эффективные методы отбора клеток, прошедших редактирование. В настоящее время существует несколько стратегий отбора целевых клонов, таких как проточная цитофлуориметрия, селекция с помощью антибиотиков и отбор с помощью чувствительных методов цифровой ПЦР. С этой целью в молекулы донорных ДНК вводят гены устойчивости к антибиотикам или кДНК генов флуоресцентных белков, а также дополнительные молчащие мутации, позволяющие отличить исходную

ДНК от донорной [32, 64, 91]. Редактированию с использованием HDR подвергали первичные кератиноциты и фибробласты, а также иПСК [91]. Редактирование, опосредованное CRISPR/Cas9, проводили также на органоидах с помощью метода, называемого независимым от гомологии трансгенезом органоидов (от англ. Homology-independent Organoid Transgenesis, CRISPR-HOT). Использование флуоресцентного репортера позволило увеличить эффективность отбора после редактирования [92]. Двойной флуоресцентный репортер применяли для детекции и количественной оценки ДЦР в геноме, определения прошедшей в клетках HDR или с-NHEJ [93].

Если рассматривать методы редактирования генодерматозов с применением HDR в хронологическом порядке, то первыми были опубликованные в 2013 году работы с применением TALEN [76]. В культивируемых первичных фибробластах больного с диагнозом РДБЭ устранили точечную мутацию, приведшую к образованию преждевременного стоп-кодона в экзоне 14 гена *COL7A1*. В последовательность донорной ДНК для анализа отличий отредактированного аллеля от исходного вводили точечные мутации: целевую с.1837 T>C, а также “молчащую” мутацию полиморфизма T>C, разрушающую сайт расщепления рестриктазой Aра1. Прошедшие редактирование клоны удалось нарастить до количеств, превосходящих используемые при трансплантации пациенту (более 5×10^8 клеток). Затем из первичных фибробластов, прошедших генетическую коррекцию, получили изогенные иПСК. Заметим, что еще раньше был опубликован метод генетической коррекции доминантно-негативной мутации в гене *KRT14* в кератиноцитах больного с БЭП [30]. HDR проходила с донорной молекулой на основе AAV6, содержащей последовательность гена *GFP* вместо экзона 3 *KRT14* и фрагмент промотора *KRT14* для направленной специфической рекомбинации. Показано, что эффективность HDR была выше, чем при случайной интеграции вирусной последовательности в геном.

С использованием HDR с участием донорной ДНК на основе gAAV (штамм AAV-DJ) проведено также редактирование мутации в *COL7A1* в иПСК, изогенных клеткам пациентов с РДБЭ [34]. Известно, что у пациентов с генерализованной формой РДБЭ часто развивается агрессивный плоскоклеточный рак. Однако неясно, обусловлено ли это хроническим воспалением или связано с измененной регуляцией экспрессии генов, вызванной недостатком C7. В описанной выше работе сравнили паттерны генной экспрессии в иПСК пациентов и в иПСК здоровых доноров, полученных репрограммированием [34]. Удалось выявить повышение экспрессии группы генов, связанных с предрасположенностью к развитию плоскоклеточного рака. Опосредованный

CRISPR/Cas9 нокаут этих генов позволил получить популяцию изогенных клеток, не экспрессирующих некоторые гены, способствующие развитию плоскоклеточного рака [34]. Проведено также опосредованное CRISPR/Cas9 редактирование изогенных и ПСК двух пациентов с РДБЭ, у одного из которых найдена гомозиготная инсерция в экзоне 19 (с.2470insG), а у второго – сложная гетерозиготная мутация в экзонах 19 и 32 (с.2470insG/с.3948insT) [91]. HDR проведена с использованием короткого одноцепочечного олигонуклеотидного донора (ООД) и плазмиды, содержащей CRISPR/Cas9. Введение в состав этой плазмиды последовательности, кодирующей mCherry, позволило отобрать нужную популяцию клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Вполне закономерно, что эффективность HDR была ниже в случае гомозиготной мутации (10%) и выше для гетерозиготного аллеля (40%). Показано также, что кератиноциты и фибробласты, репрограммированные из иПСК, содержали специфические для этих клеток маркеры дифференцировки. В этих кератиноцитах и фибробластах, выращенных в условиях 3D эквивалента кожи, после ксенотрансплантации образца эквивалента мышам с иммунодефицитом восстанавливалась экспрессия *C7*. Наличие якорных фибрилл показано с помощью просвечивающей электронной микроскопии срезов реконструированного эквивалента кожи [91].

В 2018 году Izmyryan и соавт. с помощью CRISPR/Cas9 провели успешное редактирование генома первичных кератиноцитов и фибробластов пациента с нонсенс-мутацией в экзоне 2 *COL7A1*(с.189delG) [94]. В качестве донора для HDR использовали лентивирус, не способный к интеграции в геном, без гена устойчивости к антибиотикам и флуоресцентного репортера. Эффективность HDR, оцененная с помощью цифровой капельной ПЦР, составила 11 и 15.7% в кератиноцитах и фибробластах соответственно. Это весьма высокие показатели, если принять во внимание первичные клетки с низкой эффективностью HDR и отсутствием селекции после редактирования.

Обнаружено, что не во всех успешно прошедших редактирование клетках происходит эффективное восстановление экспрессии *C7*, т.е. эффективности редактирования гена и восстановления экспрессии *C7* часто различаются. Свой вклад вносит соотношение гетеро- и гомозиготных мутаций после редактирования генома, пролиферативный потенциал клеток, их способность к дифференцировке, а также доля эпидермальных стволовых кератиноцитов с высоким пролиферативным потенциалом [95].

Интересен опыт редактирования генома гемопоэтических стволовых клеток CD34⁺, в результате которого в этих клетках увеличилась экспрессия *C7* [96]. Редактирование проведено с по-

мощью CRISPR/Cas9 и AAV6 в качестве донора для HDR. В регуляторную область гена *COL7A1* встраивали промоторный участок гена *PPP1R12C* с акцепторным сайтом сплайсинга и ген *GFP* для отбора отредактированных клонов с помощью проточной цитофлуориметрии.

Опосредуемое CRISPR/Cas9 редактирование генома проводили на модели ПоБЭ с мутацией R635X в гене *LAMB3*, кодирующем субъединицу ламинина 332 [97]. В этой работе для доставки CRISPR/Cas9 использовали аденовирус, а донорную ДНК вводили в состав модифицированного лентивируса, не способного к интеграции в геном.

Пропуск экзона как метод терапии ВБЭ. Показана возможность пропуска некоторых экзонов гена *Col7A1* (экзоны 3, 80, и 105) и функциональная значимость образующегося в результате этого укороченного продукта [98]. Судя по опубликованным данным, список таких экзонов *COL7A1*, обнаруженных в различных популяциях, еще шире [99–101]. Изучение значимости пропуска экзонов, проведенное на группе пациентов с ДДБЭ и РДБЭ в Нидерландах, позволило сделать вывод, что пропуск экзона может вызывать развитие более легкой формы заболевания с более стабильным состоянием только у пациентов с рецессивной формой заболевания [102]. На основании этого можно рекомендовать использование направленного пропуска экзона как метода коррекции мутаций, вызывающих РДБЭ. Если направить Cas9 на специфическое разрезание ДНК в области интронов, прилегающих к экзону, содержащему мутацию, то, имея специфические сайты для направляющих РНК, можно изменить последовательность целевой мРНК. Терапевтический эффект основан на использовании укороченного функционального белка, синтезируемого с модифицированной мРНК, полученной в результате изменения сплайсинга и пропуска ряда экзонов (рис. 2в).

Впервые пропуск экзона применили в генной терапии мышечной дистрофии Дюшенна [103]. Ген дистрофина, как и *COL7A1*, содержит домены, в состав которых входят экзоны, локализованные в одной рамке считывания. Исходно для пропуска экзонов, несущих мутацию, применяли антисмысловые олигонуклеотиды, действующие на сплайсинг пре-мРНК [104].

Методы повышения эффективности редактирования с участием HDR. Во многих сравнительных исследованиях эффективности работы системы CRISPR/Cas9 показано, что использование РНК-белкового комплекса Cas9 с cr/tracrRNA более эффективно, чем плазмид, их кодирующих. Для редактирования генома при генодерматозах применяют оба метода, поскольку использование плазмид более экономично и очень удобно [32, 46, 91].

В 2013 году была предложена мутантная Cas9 (Cas9n) – никаза. Нарушение активности RuvC-домена (благодаря мутации D10A) никазы позволило сильно снизить ее неспецифическую активность при редактировании [105]. Практически сразу никазу начали применять для редактирования мутаций, вызывающих генодерматозы, прежде всего ВБЭ. Редактирование мутаций в генах *KRT14* и *COL7A1*, приводящих к БЭП и РДБЭ, показало, что одновременное введение двух направляющих РНК сильно увеличивает эффективность HDR и снижает неспецифические эффекты [32, 106]. Высокая эффективность HDR подтверждается тем, что последствия с-NHEJ обнаруживаются только в 11% клонов из более 80%, отредактированных с помощью HDR [106].

Для увеличения эффективности редактирования применяют подходы, позволяющие избежать повторного разрезания ДНК уже отредактированного локуса. Например таких, как внесение в донорную ДНК блокирующих мутаций, препятствующих повторному узнаванию комплексом CRISPR/Cas9, с возможностью последующего устранения этих мутаций [107]. Примерно в половине работ, посвященных редактированию генома при ВБЭ, используется одноцепочечный донор и, в значительной части, – двухцепочечная матрица с возможностью последующей селекции [82]. В обоих случаях в донорные ДНК вносят “молчашие” нуклеотидные замены, которые не меняют аминокислотную последовательность, но приводят к образованию сайта узнавания эндонуклеазой рестрикции, что позволяет отличать клоны, подвергнутые HDR, от исходных матриц [32]. В случае двухцепочечных донорных молекул для селекции клонов, продуктов гомологичной рекомбинации, применяют кассеты, кодирующие флуоресцентные маркеры или гены устойчивости к антибиотику [32, 82].

Методы доставки компонентов системы редактирования постоянно совершенствуются. Например, разработаны подходы к доставке компонентов с помощью электропорации [51], наночастиц [108], трансдукции вирусных частиц и трансфекции плазмид.

Интерес представляет применение транспозона *piggyBac* для введения кассеты с геном устойчивости к антибиотику в плазмиду, несущую донорную ДНК, для HDR. Применение этого метода на иПСК позволило отредактировать мутации в двух экзонах гена *COL7A1* с помощью CRISPR/Cas9 [64]. Редактирование преждевременного стоп-кодона – мутации с.2005 С > Т (р.R669*) в экзоне 15, подтверждено секвенированием. С помощью Вестерн-блот-анализа получено подтверждение экспрессии полноразмерного С7 после репрограммирования иПСК в кератиноциты. Преимущество данной системы состоит в том, что

последовательность *piggyBac* можно легко бесследно удалить из генома отредактированных клеток с помощью HDR.

Редакторы оснований (РО)

Дезаминирование, происходящее с удалением аминогруппы из молекулы, приводит к транзициям, заменам А:Т на G:C в ДНК. В редактировании геномов используют также дезаминазы, работающие в тандеме с модифицированными программированными нуклеазами, так называемые Редакторы Оснований (РО) [109]. Главным преимуществом этого подхода считается отсутствие генотоксического эффекта (без накопления ДЦР не активируется система репарации). Совершенствование систем РО путем направленной эволюции и белковой инженерии привело к созданию высокоточных систем с повышенной специфичностью. Важным параметром РО-систем является “сужение окна” активности дезаминазы на ДНК в пределах нескольких нуклеотидов от направляющей РНК [110, 111]. РО также применили в генотерапии РДБЭ [112]. Новая система редактирования, содержащая аденозиндезаминазу (ABE, от англ. Adenosine deaminase Base Editor) в составе химерного белка с Cas9n, локально специфически дезаминирует А:Т в G:C, не внося при этом ДЦР в ДНК. Предложена также система на основе цитозиндезаминазы (CBE), которая в составе с никазой редактирует цитозин, осуществляя конверсию С:G в Т:А (рис. 2e). Эта система особенно ценна для редактирования в клетках человека, частыми мутациями в которых являются замены Т:А на С:G [113].

Интерес представляет редактирование мутации в гене, кодирующем транслугтаминазу 1 (TGM1) (рис. 1). Мутация с.607С > Т приводит к ламеллярному ихтиозу – орфанному аутосомно-рецессивному заболеванию человека (табл. 1). У семейной пары с одинаковой гетерозиготной мутацией в этом гене случалось невынашивание беременности. Секвенирование показало возникновение *de novo* герминальной мутации, поскольку более 98% спермы пациента содержало эту мутацию. С помощью двух разных РО на основе цитидиндезаминаз семейства APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) – SC-ABE max и ABE max-NG – проведено редактирование на зиготах. Использование этой системы обеспечило 73%-ную эффективность редактирования [28]. Таким образом показано успешное редактирование с помощью РО *in vivo* на эмбрионах.

Новые методики редактирования

Эффективность редактирования можно повысить путем изменения экспрессии факторов, влияющих на процесс редактирования.

яющих на репарацию ДЦР, с помощью увеличения специфичности систем редактирования и эффективности селекции клеток после редактирования.

Снижение экспрессии p53 в клетках млекопитающих увеличивает эффективность опосредованного CRISPR/Cas9 редактирования [114]. P53 стимулирует транскрипцию гена *CKI*, кодирующего белок p21, который блокирует переход клетки на следующую стадию клеточного цикла, останавливая его либо в фазе G1, либо в G2/M-переходе. Недавно показали, что активность CRISPR/Cas9 в клетках пигментного эпителия сетчатки с инактивированным p53 выше, чем в клетках с интактным белком p53 [114]. Активация p53 при генотоксическом стрессе приводит к дифференцировке и ПСК, обеспечивая таким образом стабильность генома стволовых клеток [115]. Если для редактирования генома используют и ПСК, то временный нокаун гена *Trp53*, кодирующего p53, или экспрессия доминантно-негативного мутантного варианта p53 могут привести к повышению эффективности редактирования [116].

При редактировании с использованием с-ННЕJ скрининг приходится проводить без обогащения отредактированных клеток с помощью селекции. Разнообразие возможных исходов репарации может затруднять процесс получения нужных клонов, поэтому разрабатывается множество моделей, направленных на предсказание этих результатов. Большинство из них основано на анализе данных, полученных после редактирования с использованием библиотек направляющих РНК [117–119]. Эти подходы могут быть полезными при подборе эффективных направляющих РНК и выборе участков для внесения разрыва. В некоторых работах результаты репарации предсказывают на основе поиска коротких гомологичных участков в области разрыва. В этом случае репарация может идти по более предсказуемому пути – с помощью соединения концов на основе коротких участков микрогомологии (ММЕJ, от англ. Microhomology Mediated End Joining) [120, 121]. Этот вид репарации можно использовать в качестве вспомогательного инструмента для бесшовного вырезания селективной кассеты после редактирования методом HDR [122].

Альтернативным подходом к редактированию с внесением одного или двух одноцепочечных разрывов является система prime editing (PE), которая позволяет вносить в геном короткие инсерции и делеции, а также более длинные фрагменты последовательности. Эта система состоит из гибридного белка spCas9 (H840A) в одной рамке считывания с обратной транскриптазой и модифицированной направляющей РНК, которая содержит на 3'-конце донорную последовательность для редактирования [123]. Проблемой при

использовании PE-системы является сложность конструирования эффективной модифицированной направляющей РНК, однако в этой области ведется активная работа [124]. Этот подход, несмотря на его новизну, начинают применять для редактирования мутаций, вызывающих генодерматозы (неопубликованные данные).

МОДЕЛИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ НА ЖИВОТНЫХ, СОЗДАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

Появление системы CRISPR/Cas9, ставшей эффективным инструментом редактирования генома, расширило возможности моделирования генодерматозов. Изучение молекулярных аспектов заболеваний, например эпидермолитического ихтиоза [125], обычно начинают с создания моделей в клеточных культурах. Затем, при получении потенциально клинически значимых результатов, проводят доклинические исследования, для которых необходимо создание моделей на животных. Систему CRISPR/Cas9 можно использовать в эмбрионах животных и создавать с ее помощью мутации, ортологичные мутациям у человека [51]. Орфанные генодерматозы встречаются в изолированных популяциях диких животных или возникают в процессе селекции, например, мутации в гене *Col7a1* вызывают РДБЭ у собак некоторых пород [126, 127] и у фордервальдской породы крупного рогатого скота [128]. В гене тирозиназы макаков резусов найдена мутация, вызывающая альбинизм, сходный по проявлениям с глазочным альбинизмом у человека [129]. На модели РДБЭ у собак породы ретривер изучено влияние белковой терапии рекомбинантным С7 [83]. Однако применение данных моделей серьезно ограничивается структурными различиями кожи животных и человека. Так, например, только у новорожденных мышат структура эпидермиса сходна с эпидермисом человека. Недавно у нескольких детенышей из одного помета макаков резусов обнаружили мутацию в гене *krt5*, вызывающую тяжелую форму БЭП [130]. В 1999 году создали мышей с нокаутом гена *Col7a1*, у которых с помощью стабильной интеграции открытую рамку считывания в области экзонов 46–69 заменили на ген устойчивости к неомицину. Однако такие мыши умирали через 2 недели после рождения [131]. Впоследствии получили другую линию гипоморфных мышей, которые имели все признаки тяжелого заболевания при сохранении небольшого уровня экспрессии С7. Опосредованное рекомбиназой Сге встраивание кассеты устойчивости к неомицину разрывало рамку считывания коллагена после второго экзона, что привело к значительному снижению количества белка [132]. Интересно, что в тканях гомозиготных трансген-

ных животных оставалось некоторое количество С7 (около 10%): синтез полноразмерного транскрипта происходил, как выяснилось, за счет аберрантного сплайсинга в области экзона 2 *Col7a1* [132]. Впоследствии получили модели с индуцибельным нокаутом *Col7a1*. С этой целью использовали Cre-рекомбиназу, при помощи которой в ответ на добавление тамоксифена вырезали фрагмента гена, начиная с экзона 2 [133]. Эти модели использовали для проверки амелиоративного эффекта генотерапевтических продуктов, например, рекомбинантного белка С7, воздействия лентивирусной трансдукции, инъекций аллогенных мезенхимальных стволовых клеток [83, 134]. Индуцибельный нокаут *Col7a1* позволил уточнить время жизни С7 во внеклеточном матриксе (белок живет примерно 30 дней, ранее считалось, что намного дольше) и изучить механизмы нарушения заживления ран при РДБЭ, особенности образования грануляционной ткани и привлечение клеток, провоцирующих воспаление [135]. В 2017 году систему редактирования генома CRISPR/Cas9 применили *in vivo* сначала для создания гипоморфных мышей с мутацией в экзоне 80 *Col7a1*, а затем для редактирования этой мутации [51]. Получена линия мышей с нокаутом эндогенного гена *Col17* и встраиванием человеческого ортолога этого гена с мутацией, вызывающей буллезный пемфигоид — воспалительное аутоиммунное заболевание кожи. Образование пузырей и эрозий на коже при этом заболевании обусловлено выработкой антител IgG, направленных на компонент полудесмосом — антиген буллезного пемфигоида, белок BP180 [136]. На модели гуманизированной мыши проверен терапевтический эффект аллогенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток человека.

На мышах моделировали эпидермолитический ладонно-подошвенный кератоз, при котором наблюдаются нарушения в дифференцировке и пролиферации эпидермиса с гиперкератозом [137]. Ладонно-подошвенный кератоз вызывается аутосомно-доминантными мутациями в генах, кодирующих кератины. С целью моделирования этого заболевания получили трансгенных мышей с гетерозиготной мутацией — инсерцией с.434delAinsGGCT (р. Tyr144delinsTrpLeu) в *Krt9*. Эту мутацию удалили с применением CRISPR/Cas9 и одиночной направляющей РНК. Три инъекции этой системы *in vivo* привели к снижению уровня экспрессии К9 (до 14.6%) и проявлений кератодермии.

Использование методов редактирования генома для моделирования генодерматозов на животных существенно продвинуло изучение механизмов этих заболеваний, а в ряде случаев способствовало нахождению новых подходов к генной терапии этих патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегии генной терапии уже более 15 лет применяются при генодерматозах, в основном при ВБЭ. Большое внимание уделяется созданию генотерапевтических препаратов, доступных для пациентов с различными мутациями в одном и том же гене. Использование системы CRISPR/Cas9 и ее различных вариантов постепенно вытесняет остальные методы генотерапии. В настоящее время получено несколько патентов на использование подходов *ex vivo* редактирования гена *COL7A1*, мутации в котором вызывают ДБЭ. Редактирование генома первичных пациент-специфичных клеток применяется не меньше, чем редактирование полученных из них иПСК, с последующим репрограммированием в изогенные линии различного типа. Вошедшее в практику широкомасштабное секвенирование, проводимое после редактирования генома, позволяет быстро оценить его эффективность и наличие неспецифических (off target) эффектов. Определяющее значение для подбора стратегии геномного редактирования имеет тип мутации, характер ее наследования и нуклеотидное окружение. К доминантно-негативным мутациям можно применять методы редактирования с получением нокаутов. После редактирования мутантных аллелей для получения целевых клонов применяют функциональный отбор, направленный на восстановление нормального фенотипа. При редактировании рецессивно наследуемых мутаций чаще используют HDR, которая имеет низкую эффективность. Эффективность HDR повышают с помощью различных подходов, совершенствуют и методы доставки, и методы селективного отбора целевых клонов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-29-04044) и Министерством науки и высшего образования (грант № 075-15-2019-1789 для Иваненко А.В.)

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naso G., Petrova A. (2020) Cellular therapy options for genetic skin disorders with a focus on recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. Med. Bull.* **136**, 30–45.
2. Kueckelhaus M., Rothoefl T., De Rosa L., Yeni B., Ohmann T., Maier C., Eitner L., Metze D., Losi L., Secone Seconetti A., De Luca M., Hirsch T. (2021) Transgenic epidermal cultures for junctional epidermolysis bullosa — 5-year outcomes. *N. Eng. J. Med.* **385**, 2264–2270.
3. Dinnes J., Deeks J.J., Chuchu N., Matin R.N., Wong K.Y., Aldridge R.B., Durack A., Gulati A., Chan S.A., Johnston L., Bayliss S.E., Leonardi-Bee J.,

- Takwoingi Y., Davenport C., O'Sullivan C., Tehrani H., Williams H.C. (2018) Visual inspection and dermoscopy, alone or in combination, for diagnosing keratinocyte skin cancers in adults. *Cochrane Database Systematic Rev.* **2018**, CD011901.
4. Dourado Alcorde M., Sogayar M.C., Demasi M.A. (2019) Patent landscape of molecular and cellular targeted therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exper. Opin. Therap. Patents.* **29**, 327–337.
 5. Lwin S.M., Syed F., Di W.-L., Kadiyirire T., Liu L., Guy A., Petrova A., Abdul-Wahab A., Reid F., Phillips R., Elstad M., Georgiadis C., Aristodemou S., Lovell P.A., McMillan J.R., Mee J., Miskinyte S., Titeux M., Ozoemena L., Pramanik R., Serrano S., Rowles R., Maurin C., Orrin E., Martinez-Queipo M., Rashidghamat E., Tziotzios C., Onoufriadis A., Chen M., Chan L., Farzaneh F., Del Rio M., Tolar J., Bauer J.W., Larcher F., Antoniou M.N., Hovnanian A., Thrasher A.J., Mellerio J.E., Qasim W., McGrath J.A. (2019) Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**, 126243.
 6. Sibrashvili 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. (2016) Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Am. Med. Assoc.* **316**, 1808–1817.
 7. Кубанов А.А., Чикин В.В., Карамова А.Э., Мончаковская Е.С. (2021) Наружная терапия больных врожденным буллезным эпидермолизом. *Вест. Дерматол. Венерол.* **97**, 6–19.
 8. Bardhan A., Bruckner-Tuderman L., Chapple I.L.C., Fine J.-D., Harper N., Has C., Magin T.M., Marinkovich M.P., Marshall J.F., McGrath J.A., Mellerio J.E., Polson R., Heagerty A.H. (2020) Epidermolysis bullosa. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **6**, 78.
 9. Yang W.S., Kang S., Sung J., Kleinman H.K. (2019) Thymosin β 4: potential to treat epidermolysis bullosa and other severe dermal injuries. *Eur. J. Dermatol. EJD.* **29**, 459–467.
 10. Feramisco J.D., Sadreyev R.I., Murray M.L., Grishin N.V., Tsao H. (2009) Phenotypic and genotypic analyses of genetic skin disease through the online Mendelian inheritance in man (OMIM) Database. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2628–2636.
 11. Rao R., Mellerio J., Bhogal B.S., Groves R. (2012) Immunofluorescence antigen mapping for hereditary epidermolysis bullosa. *Indian J. Dermatol., Venereol. Leprol.* **78**, 692–697.
 12. Yenamandra V.K., Bhari N., Ray S.B., Sreenivas V., Dinda A.K., Scaria V., Sharma V.K., Sethuraman G. (2017) Diagnosis of inherited epidermolysis bullosa in resource-limited settings: immunohistochemistry revisited. *Dermatol. (Basel).* **233**, 326–332.
 13. Ohashi M., Shu E., Nagai M., Murase K., Nakano H., Tamai K., Sawamura D., Hiroka T., Seishima M., Kitajima Y., Aoyama Y. (2011) Two cases of recessive dystrophic epidermolysis bullosa diagnosed as severe generalized. *J. Dermatology.* **38**, 893–899.
 14. Rossi S., Castiglia D., Pisaneschi E., Diociaiuti A., Stracuzzi A., Cesario C., Mariani R., Floriddia G., Zambruno G., Boldrini R., Abeni D., Novelli A., Zalggi R., El Hachem M. (2021) Immunofluorescence mapping, electron microscopy and genetics in the diagnosis and sub-classification of inherited epidermolysis bullosa: a single-centre retrospective comparative study of 87 cases with long-term follow-up. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.* **35**, 1007–1016.
 15. Крылова Ю., Дробинцева А., Полякова В., Кветной И., Пантелеев Л., Мусихин С., Barzda В. (2015) Нелинейная оптическая микроскопия. *Биотехно-сфера.* 2–7.
 16. Anker P., Fésús L., Kiss N., Noll J., Becker K., Kuroli E., Mayer B., Bozsányi S., Lórinz K., Lihacova I., Lihachev A., Lange M., Wikonkál N., Medvecz M. (2021) Visualization of keratin with diffuse reflectance and autofluorescence imaging and nonlinear optical microscopy in a rare keratinopathic ichthyosis. *Sensors (Basel).* **21**, 1105.
 17. Has C., Bruckner-Tuderman L. (2014) The genetics of skin fragility. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **15**, 245–268.
 18. Coulombe P.A., Lee C.-H. (2012) Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 763–775.
 19. Goldberg I., Fruchter D., Meilick A., Schwartz M.E., Sprecher E. (2014) Best treatment practices for *Pachyonychia congenita*. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **28**, 279–285.
 20. Smith F.J., Hansen C.D., Hull P.R., Kaspar R.L., McLean W.I., O'Toole E., Sprecher E. (2006) *Pachyonychia congenita*. In: *GeneReviews®*. Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Gripp K.W., Mirzaa G.M., Amemiya A. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle.
 21. van den Akker P.C., van Essen A.J., Kraak M.M.J., Meijer R., Nijenhuis M., Meijer G., Hofstra R.M.W., Pas H.H., Scheffer H., Jonkman M.F. (2009) Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J. Dermatol. Sci.* **56**, 9–18.
 22. Dang N., Murrell D.F. (2008) Mutation analysis and characterization of *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **17**, 553–568.
 23. Dang N., Klingberg S., Marr P., Murrell D.F. (2007) Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel *COL7A1* variants. *J. Dermatol. Sci.* **46**, 169–178.
 24. Freiberg R.A., Choate K.A., Deng H., Alperin E.S., Shapiro L.J., Khavari P.A. (1997) A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 927–933.
 25. March O.P., Lettner T., Klausegger A., Ablinger M., Kocher T., Hainzl S., Peking P., Lackner N., Rajan N., Hofbauer J.P., Guttman-Gruber C., Bygum A., Koller U., Reichelt J. (2019) Gene editing-mediated disruption of epidermolytic ichthyosis-associated

- KRT10 alleles restores filament stability in keratinocytes. *J. Investigat. Dermatol.* **139**, 1699–1710.e6.
26. Magnaldo T., Sarasin A. (2004) *Xeroderma pigmentosum*: from symptoms and genetics to gene-based skin therapy. *Cells Tissues Organs.* **177**, 189–198.
 27. Warrick E., Garcia M., Chagnoleau C., Chevallier O., Bergoglio V., Sartori D., Mavilio F., Angulo J.F., Avril M.-F., Sarasin A., Larcher F., Del Rio M., Bernerd F., Magnaldo T. (2012) Preclinical corrective gene transfer in xeroderma pigmentosum human skin stem cells. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **20**, 798–807.
 28. Dang L., Zhou X., Zhong X., Yu W., Huang S., Liu H., Chen Y., Zhang W., Yuan L., Li L., Huang X., Li G., Liu J., Tong G. (2022) Correction of the pathogenic mutation in *TGM1* gene by adenine base editing in mutant embryos. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **30**, 175–183.
 29. Gálvez V., Chacón-Solano E., Bonafont J., Mencía Á., Di W.-L., Murillas R., Llamas S., Vicente A., Del Rio M., Carretero M., Larcher F. (2020) Efficient CRISPR-Cas9-mediated gene ablation in human keratinocytes to recapitulate genodermatoses: modeling of Netherton syndrome. *Mol. Therapy – Meth. Clin. Dev.* **18**, 280–290.
 30. Petek L.M., Fleckman P., Miller D.G. (2010) Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **18**, 1624–1632.
 31. Aushev M., Koller U., Mussolino C., Cathomen T., Reichelt J. (2017) Traceless targeting and isolation of gene-edited immortalized keratinocytes from epidermolysis bullosa simplex patients. *Mol. Therapy. Meth. Clin. Dev.* **6**, 112–123.
 32. Kocher T., Peking P., Klausegger A., Murauer E.M., Hofbauer J.P., Wally V., Lettner T., Hainzl S., Ablinger M., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. (2017) Cut and paste: efficient homology-directed repair of a dominant negative KRT14 mutation via CRISPR/Cas9 nickases. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **25**, 2585–2598.
 33. Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., Bauer J.W., Pellegrini G., De Rosa L., Scaglione D., Reichelt J., Klausegger A., Kneisz D., Romano O., Secone Seconetti A., Contin R., Enzo E., Jurman I., Carulli S., Jacobsen F., Luecke T., Lehnhardt M., Fischer M., Kueckelhaus M., Quaglino D., Morgante M., Bicciato S., Bondanza S., De Luca M. (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature.* **551**, 327–332.
 34. Sebastiano V., Zhen H.H., Haddad B., Derafshi B.H., Bashkirova E., Melo S.P., Wang P., Leung T.L., Siprashvili Z., Tichy A., Li J., Ameen M., Hawkins J., Lee S., Li L., Schwertschkow A., Bauer G., Lisowski L., Kay M.A., Kim S.K., Lane A.T., Wernig M., Oro A.E. (2014) Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra163.
 35. van den Akker P.C., Mellerio J.E., Martinez A.E., Liu L., Meijer R., Dopping-Hepenstal P.J.C., van Essen A.J., Scheffer H., Hofstra R.M.W., McGrath J.A., Jonkman M.F. (2011) The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen. *J. Med. Genet.* **48**, 160–167.
 36. Nickless A., Bailis J.M., You Z. (2017) Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* **7**, 26.
 37. Supek F., Lehner B., Lindeboom R.G.H. (2021) To NMD or not to NMD: nonsense-mediated mRNA decay in cancer and other genetic diseases. *Trends Genet.* **37**, 657–668.
 38. Khajavi M., Inoue K., Lupski J.R. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet: EJHG.* **14**, 1074–1081.
 39. March O.P., Kocher T., Koller U. (2020) Context-dependent strategies for enhanced genome editing of genodermatoses. *Cells.* **9** (1), 112. doi.org/https://doi.org/10.3390/cells9010112
 40. Mecklenbeck S., Compton S.H., Mejía J.E., Cervini R., Hovnanian A., Bruckner-Tuderman L., Barrandon Y. (2002) A microinjected COL7A1-PAC vector restores synthesis of intact procollagen VII in a dystrophic epidermolysis bullosa keratinocyte cell line. *Hum. Gene Therapy.* **13**, 1655–1662.
 41. Sat E., Leung K.H., Bruckner-Tuderman L., Cheah K.S. (2000) Tissue-specific expression and long-term deposition of human collagen VII in the skin of transgenic mice: implications for gene therapy. *Gene Therapy.* **7**, 1631–1639.
 42. Di W.-L., Larcher F., Semenova E., Talbot G.E., Harper J.I., Del Rio M., Thrasher A.J., Qasim W. (2011) *Ex-vivo* gene therapy restores LEKTI activity and corrects the architecture of Netherton syndrome-derived skin grafts. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **19**, 408–416.
 43. Lwin S.M., Syed F., Di W.L., Kadiyirire T., Liu L., Guy A., Petrova A., Abdul-Wahab A., Reid F., Phillips R., Elstad M., Georgiadis C., Aristodemou., Lovell P.A., McMillan J.R., Mee J., Miskinyte S., Titeux M., Ozoemena L., Pramanik R., Serrano S., Rowles R., Maurin C., Orrin E., Martinez-Queipo M., Rashidghamat E., Tziotzios C., Onoufriadis A., Chen M., Chan L., Farzaneh F., Del Rio M., Tolar J., Bauer J.W., Larcher F., Antoniou M.N., Hovnanian A., Thrasher A.J., Mellerio J.E., Qasim W., McGrath J.A. (2019) Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**(11), e126243. https://doi.org/10.1172/jci.insight.126243
 44. Georgiadis C., Syed F., Petrova A., Abdul-Wahab A., Lwin S.M., Farzaneh F., Chan L., Ghani S., Fleck R.A., Glover L., McMillan J.R., Chen M., Thrasher A.J., McGrath J.A., Di W.-L., Qasim W. (2016) Lentiviral engineered fibroblasts expressing codon-optimized COL7A1 restore anchoring fibrils in RDEB. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 284–292.
 45. Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M. (2006) Correction of junction-

- al epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* **12**, 1397–1402.
46. Melo S.P., Lisowski L., Bashkirova E., Zhen H.H., Chu K., Keene D.R., Marinkovich M.P., Kay M.A., Oro A.E. (2014) Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **22**, 725–733.
 47. Roedel D., Oji V., Buters J.T.M., Behrendt H., Braun-Falco M. (2011) rAAV2-mediated restoration of LEKTI in LEKTI-deficient cells from Netherton patients. *J. Dermatol. Sci.* **61**, 194–198.
 48. South A.P., Uitto J. (2016) Type VII collagen replacement therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa-how much, how often? *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1079–1081.
 49. Eichstadt S., Barriga M., Ponakala A., Teng C., Nguyen N.T., Siplashvili Z., Nazarov J., Gorell E.S., Chiou A.S., Taylor L., Khuu P., Keene D.R., Rieger K., Khosla R.K., Furukawa L.K., Lorenz H.P., Marinkovich M.P., Tang J.Y. (2019) Phase 1/2a clinical trial of gene-corrected autologous cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**, 130554.
 50. Woodley D.T., Krueger G.G., Jorgensen C.M., Fairley J.A., Atha T., Huang Y., Chan L., Keene D.R., Chen M. (2003) Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1021–1028.
 51. Wu W., Lu Z., Li F., Wang W., Qian N., Duan J., Zhang Y., Wang F., Chen T. (2017) Efficient *in vivo* gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 1660–1665.
 52. Gurevich I., Agarwal P., Zhang P., Dolorito J.A., Oliver S., Liu H., Reitze N., Sarma N., Bagci I.S., Sridhar K., Kakarla V., Yenamandra V.K., O'Malley M., Prisco M., Tufa S.F., Keene D.R., South A.P., Krishnan S.M., Marinkovich M.P. (2022) *In vivo* topical gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1 and 2 trial. *Nat. Med.* **28**(4), 780–789.
 53. Pasmooij A.M.G., Pas H.H., Bolling M.C., Jonkman M.F. (2007) Revertant mosaicism in junctional epidermolysis bullosa due to multiple correcting second-site mutations in LAMB3. *J. Clin. Invest.* **117**, 1240–1248.
 54. Umegaki-Arao N., Pasmooij A.M.G., Itoh M., Cerise J.E., Guo Z., Levy B., Gostyński A., Rothman L.R., Jonkman M.F., Christiano A.M. (2014) Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra164.
 55. Jonkman M.F., Pasmooij A.M.G. (2009) Revertant mosaicism – patchwork in the skin. *N. Eng. J. Med.* **360**, 1680–1682.
 56. Twaroski K., Eide C., Riddle M.J., Xia L., Lees C.J., Chen W., Mathews W., Keene D.R., McGrath J.A., Tolar J. (2019) Revertant mosaic fibroblasts in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. J. Dermatol.* **181**, 1247–1253.
 57. Tolar J., McGrath J.A., Xia L., Riddle M.J., Lees C.J., Eide C., Keene D.R., Liu L., Osborn M.J., Lund T.C., Blazar B.R., Wagner J.E. (2014) Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1246–1254.
 58. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **180**, 2581–2587.
 59. Geyer M.B., Radhakrishnan K., Giller R., Umegaki N., Harel S., Kiuru M., Morel K.D., LeBoeuf N., Kandel J., Bruckner A., Fabricatore S., Chen M., Woodley D., McGrath J., Baxter-Lowe L., Uitto J., Christiano A.M., Cairo M.S. (2015) Reduced toxicity conditioning and allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Pediatrics.* **167**, 765–769.e1.
 60. Fujita Y., Komatsu M., Lee S.E., Kushida Y., Nakayama-Nishimura C., Matsumura W., Takashima S., Shinkuma S., Nomura T., Masutomi N., Kawamura M., Dezawa M., Shimizu H. (2021) Intravenous injection of muse cells as a potential therapeutic approach for epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **141**, 198–202.e6.
 61. Rashidghamat E., Kadiyire T., Ayis S., Petrof G., Liu L., Pullabhatla V., Ainali C., Guy A., Aristodemou S., McMillan J.R., Ozoemena L., Mee J., Pramanik R., Saxena A., Nuamah R., de Rinaldis E., Serrano S., Maurin C., Martinez-Queipo M., Lwin S.M., Ilic D., Martinez A., Dazzi F., Slaper-Cortenbach I., Westinga K., Zeddies S., van den Broek M., Onoufriadis A., Mellerio J.E., McGrath J.A. (2020) Phase I/II open-label trial of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cell therapy in adults with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **83**, 447–454.
 62. Masonic Cancer Center, University of Minnesota (2022) MT2015-20: biochemical correction of severe epidermolysis bullosa by allogeneic cell transplantation and serial donor mesenchymal cell infusions. *Clin. Trial Registration, Clinicaltrials.gov*
 63. Ebens C.L., McGrath J.A., Tamai K., Hovnanian A., Wagner J.E., Riddle M.J., Keene D.R., DeFor T.E., Tryon R., Chen M., Woodley D.T., Hook K., Tolar J. (2019) Bone marrow transplant with post-transplant cyclophosphamide for recessive dystrophic epidermolysis bullosa expands the related donor pool and permits tolerance of nonhaematopoietic cellular grafts. *Br. J. Dermatol.* **181**, 1238–1246.
 64. Itoh M., Kawagoe S., Tamai K., Nakagawa H., Asahina A., Okano H.J. (2020) Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system. *J. Dermatol. Sci.* **98**, 163–172.
 65. Ruiz-Torres S., Lambert P.F., Wikenheiser-Brockamp K.A., Wells S.I. (2021) Directed differentiation

- of human pluripotent stem cells into epidermal stem and progenitor cells. *Mol. Biol. Rep.* **48**, 6213–6222.
66. Wenzel D., Bayerl J., Nyström A., Bruckner-Tuderman L., Meixner A., Penninger J.M. (2014) Genetically corrected iPSCs as cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra165.
 67. Itoh M., Kiuru M., Cairo M.S., Christiano A.M. (2011) Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 8797–8802.
 68. Blackford A.N., Jackson S.P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell.* **66**, 801–817.
 69. Kantidze O.L., Velichko A.K., Luzhin A.V., Petrova N.V., Razin S.V. (2018) Synthetically lethal interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends Cancer.* **4**, 755–768.
 70. Goodarzi A.A., Yu Y., Riballo E., Douglas P., Walker S.A., Ye R., Härer C., Marchetti C., Morrice N., Jeggo P.A., Lees-Miller S.P. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates *Artemis* endonuclease activity. *EMBO J.* **25**, 3880–3889.
 71. Her J., Bunting S.F. (2018) How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **293**, 10502–10511.
 72. Mao Z., Bozzella M., Seluanov A., Gorbunova V. (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair.* **7**, 1765–1771.
 73. Symington L.S. (2016) Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 195–212.
 74. Shamanna R.A., Lu H., de Freitas J.K., Tian J., Croteau D.L., Bohr V.A. (2016) WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat. Commun.* **7**, 13785.
 75. Jayavaradhan R., Pillis D.M., Goodman M., Zhang F., Zhang Y., Andreassen P.R., Malik P. (2019) CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nat. Commun.* **10**, 2866.
 76. Osborn M.J., Starker C.G., McElroy A.N., Webber B.R., Riddle M.J., Xia L., DeFeo A.P., Gabriel R., Schmidt M., Von Kalle C., Carlson D.F., Maeder M.L., Joung J.K., Wagner J.E., Voytas D.F., Blazar B.R., Tolar J. (2013) TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy.* **21**, 1151–1159.
 77. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J.A. (2015) Structural biology. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science (New York, N.Y.)*. **348**, 1477–1481.
 78. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* **351**, 84–88.
 79. Kim D.Y., Lee J.M., Moon S.B., Chin H.J., Park S., Lim Y., Kim D., Koo T., Ko J.-H., Kim Y.-S. (2022) Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus. *Nat. Biotechnol.* **40**, 94–102.
 80. Yang H., Ren S., Yu S., Pan H., Li T., Ge S., Zhang J., Xia N. (2020) Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *Internat. J. Mol. Sci.* **21**, E6461.
 81. Shinkuma S., Guo Z., Christiano A.M. (2016) Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 5676–5681.
 82. Kocher T., Koller U. (2021) Chapter three – Advances in gene editing strategies for epidermolysis bullosa. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **182**, 81–109.
 83. Gretzmeier C., Pin D., Kern J.S., Chen M., Woodley D.T., Bruckner-Tuderman L., de Souza M.P., Nyström A. (2022) Systemic collagen VII replacement therapy for advanced recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **142**(4), 1094–1102. e3.
 84. Zauner R., Wimmer M., Dorfer S., Ablinger M., Koller U., Piñón Hofbauer J., Guttman-Gruber C., Bauer J.W., Wally V. (2022) Transcriptome-guided drug repurposing for aggressive SCCs. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**, 1007.
 85. Vanden Oever M., Muldoon D., Mathews W., Tolar J. (2021) Fludarabine modulates expression of type VII collagen during haematopoietic stem cell transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. J. Dermatol.* **185**, 380–390.
 86. Chamorro C., Mencía A., Almarza D., Duarte B., Büning H., Sallach J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. (2016) Gene editing for the efficient correction of a recurrent *COL7A1* mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. *Mol. Therapy. Nucl. Acids.* **5**, e307.
 87. Mencía Á., Chamorro C., Bonafont J., Duarte B., Holguin A., Illera N., Llamas S.G., Escámez M.J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. (2018) Deletion of a pathogenic mutation-containing exon of *COL7A1* allows clonal gene editing correction of RDEB patient epidermal stem cells. *Mol. Therapy. Nucl. Acids.* **11**, 68–78.
 88. Bonafont J., Mencía Á., García M., Torres R., Rodríguez S., Carretero M., Chacón-Solano E., Modamio-Høybjør S., Marinas L., León C., Escamez M.J., Hausser I., Del Río M., Murillas R., Larcher F. (2019) Clinically relevant correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **27**, 986–998.
 89. Sawamura D., Goto M., Yasukawa K., Sato-Matsumura K., Nakamura H., Ito K., Nakamura H., Tomita Y., Shimizu H. (2005) Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Hum. Genet.* **50**, 543–546.
 90. Takashima S., Shinkuma S., Fujita Y., Nomura T., Ujiie H., Natsuga K., Iwata H., Nakamura H., Vorobyev A., Abe R., Shimizu H. (2019) Efficient gene re-framing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa with CRISPR/Cas9. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1711–1721.e4.

91. Jacków J., Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y.S., Shin J.U., Hayashi R., DeLorenzo D., Kabata Y., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C., Christiano A.M. (2019) CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPSCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 26846–26852.
92. Artegiani B., Hendriks D., Beumer J., Kok R., Zheng X., Joore I., Chuva de Sousa Lopes S., van Zon J., Tans S., Clevers H. (2020) Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing. *Nat. Cell Biol.* **22**, 321–331.
93. Eki R., She J., Parlak M., Benamar M., Du K.-P., Kumar P., Abbas T. (2020) A robust CRISPR-Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair. *Nucl. Acids Res.* **48**, e126.
94. Izmiryani A., Ganier C., Bovolenta M., Schmitt A., Mavilio F., Hovnanian A. (2018) *Ex vivo* COL7A1 correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9 and homology-directed repair. *Mol. Therapy—Nucl. Acids*. **12**, 554–567.
95. Kocher T., Bischof J., Haas S.A., March O.P., Liemberger B., Hainzl S., Illmer J., Hoog A., Muigg K., Binder H.-M., Klausegger A., Strunk D., Bauer J.W., Cathomen T., Koller U. (2021) A non-viral and selection-free COL7A1 HDR approach with improved safety profile for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy—Nucl. Acids*. **25**, 237–250.
96. Osborn M.J., Lees C.J., McElroy A.N., Merkel S.C., Eide C.R., Mathews W., Feser C.J., Tschann M., McElmury R.T., Webber B.R., Kim C.J., Blazar B.R., Tolar J. (2018) CRISPR/Cas9-based cellular engineering for targeted gene overexpression. *Internat. J. Mol. Sci.* **19**, E946.
97. Benati D., Miselli F., Cocchiarella F., Patrizi C., Carretero M., Baldassarri S., Ammendola V., Has C., Colloca S., Rio M.D., Larcher F., Recchia A. (2018) CRISPR/Cas9-mediated *in situ* correction of LAMB3 gene in keratinocytes derived from a junctional epidermolysis bullosa patient. *Mol. Therapy*. **26**, 2592–2603.
98. Bornert O., Kühl T., Bremer J., van den Akker P.C., Pasmooij A.M., Nyström A. (2016) Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in COL7A1 reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. **24**, 1302–1311.
99. Koga H., Hamada T., Ishii N., Fukuda S., Sakaguchi S., Nakano H., Tamai K., Sawamura D., Hashimoto T. (2011) Exon 87 skipping of the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Dermatol.* **38**, 489–492.
100. McGrath J.A., Ashton G.H., Mellerio J.E., Salas-Alanis J.C., Swensson O., McMillan J.R., Eady R.A. (1999) Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing nonsense or frameshift mutations. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 314–321.
101. Saito M., Masunaga T., Ishiko A. (2009) A novel *de novo* splice-site mutation in the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB): specific exon skipping could be a prognostic factor for DDEB pruriginosa. *Clin. Exp. Dermatol.* **34**, e934–936.
102. Bremer J., van der Heijden E.H., Eichhorn D.S., Meijer R., Lemmink H.H., Scheffer H., Sinke R.J., Jonkman M.F., Pasmooij A.M.G., Van den Akker P.C. (2019) Natural exon skipping sets the stage for exon skipping as therapy for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy—Nucl. Acids*. **18**, 465–475.
103. Lim K.R.Q., Yoon C., Yokota T. (2018) Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Personalized Med.* **8**, 38.
104. Vermeer F.C., Bremer J., Sietsma R.J., Sandilands A., Hickerson R.P., Bolling M.C., Pasmooij A.M.G., Lemmink H.H., Swertz M.A., Knoers N.V.A.M., van der Velde K.J., van den Akker P.C. (2021) Therapeutic prospects of exon skipping for epidermolysis bullosa. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**, 12222.
105. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.-Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. **154**, 1380–1389.
106. Kocher T., Wagner R.N., Klausegger A., Guttmann-Gruber C., Hainzl S., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. (2019) Improved double-nicking strategies for COL7A1 editing by homologous recombination. *Mol. Therapy—Nucl. Acids*. **18**, 496–507.
107. Paquet D., Kwart D., Chen A., Sproul A., Jacob S., Teo S., Olsen K.M., Gregg A., Noggle S., Tessier-Lavigne M. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*. **533**, 125–129.
108. Zhang X., Jin H., Huang X., Chaurasiya B., Dong D., Shanley T.P., Zhao Y.-Y. (2022) Robust genome editing in adult vascular endothelium by nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 plasmid DNA. *Cell Rept.* **38**, 110196.
109. Huang T.P., Newby G.A., Liu D.R. (2021) Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells. *Nat. Protocols*. **16**, 1089–1128.
110. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. **551**, 464–471.
111. Rees H.A., Komor A.C., Yeh W.-H., Caetano-Lopes J., Warman M., Edge A.S.B., Liu D.R. (2017) Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat. Commun.* **8**, 15790.
112. Osborn M.J., Newby G.A., McElroy A.N., Knipping F., Nielsen S.C., Riddle M.J., Xia L., Chen W., Eide C.R., Webber B.R., Wandall H.H., Dabelsteen S., Blazar B.R., Liu D.R., Tolar J. (2020) Base editor correction of COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient-derived fibroblasts and iPSCs. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 338–347.e5.
113. Doman J.L., Raguram A., Newby G.A., Liu D.R. (2020) Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 620–628.

114. Bowden A.R., Morales-Juarez D.A., Sczaniecka-Clift M., Agudo M.M., Lukashchuk N., Thomas J.C., Jackson S.P. (2020) Parallel CRISPR-Cas9 screens clarify impacts of p53 on screen performance. *eLife*. **9**, e55325.
115. Fu X., Wu S., Li B., Xu Y., Liu J. (2020) Functions of p53 in pluripotent stem cells. *Protein Cell*. **11**, 71–78.
116. Ihry R.J., Worringer K.A., Salick M.R., Frias E., Ho D., Theriault K., Kommineni S., Chen J., Sondey M., Ye C., Randhawa R., Kulkarni T., Yang Z., McAllister G., Russ C., Reece-Hoyes J., Forrester W., Hoffman G.R., Dolmetsch R., Kaykas A. (2018) p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **24**, 939–946.
117. Allen F., Crepaldi L., Alsinet C., Strong A.J., Kleshchevnikov V., De Angeli P., Páleníková P., Khodak A., Kiselev V., Kosicki M., Bassett A.R., Harding H., Galanty Y., Muñoz-Martínez F., Metzakopian E., Jackson S.P., Parts L. (2019) Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 64–72.
118. Chakrabarti A.M., Henser-Brownhill T., Monserrat J., Poetsch A.R., Luscombe N.M., Scaffidi P. (2019) Target-specific precision of CRISPR-mediated genome editing. *Mol. Cell*. **73**, 699–713.e6.
119. Shen M.W., Arbab M., Hsu J.Y., Worstell D., Culbertson S.J., Krabbe O., Cassa C.A., Liu D.R., Gifford D.K., Sherwood R.I. (2018) Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*. **563**, 646–651.
120. Bae S., Kweon J., Kim H.S., Kim J.-S. (2014) Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat. Methods*. **11**, 705–706.
121. Tatioussian K.J., Clark R.D.E., Huang C., Thornton M.E., Grubbs B.H., Cannon P.M. (2021) Rational selection of CRISPR-Cas9 guide RNAs for homology-directed genome editing. *Mol. Therapy*. **29**, 1057–1069.
122. Kim S.-I., Matsumoto T., Kagawa H., Nakamura M., Hirohata R., Ueno A., Ohishi M., Sakuma T., Soga T., Yamamoto T., Woltjen K. (2018) Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat. Commun.* **9**, 939.
123. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. **576**, 149–157.
124. Hsu J.Y., Grünwald J., Szalay R., Shih J., Anzalone A.V., Lam K.C., Shen M.W., Petri K., Liu D.R., Joung J.K., Pinello L. (2021) PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. *Nat. Commun.* **12**, 1034.
125. Renz P., Imahorn E., Spoerri I., Aushev M., March O.P., Wariwoda H., Von Arb S., Volz A., Itin P.H., Reichelt J., Burger B. (2019) Arginine- but not alanine-rich carboxy-termini trigger nuclear translocation of mutant keratin 10 in ichthyosis with confetti. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 8442–8452.
126. Garcia T.M., Kiener S., Jagannathan V., Russell D.S., Leeb T. (2020) A COL7A1 variant in a litter of neonatal Basset Hounds with dystrophic epidermolysis bullosa. *Genes*. **11**, E1458.
127. Niskanen J., Dillard K., Arumilli M., Salmela E., Anttila M., Lohi H., Hytönen M.K. (2017) Nonsense variant in *COL7A1* causes recessive dystrophic epidermolysis bullosa in Central Asian Shepherd dogs. *PLoS One*. **12**, e0177527.
128. Pausch H., Ammermüller S., Wurmser C., Hamann H., Tetens J., Drögemüller C., Fries R. (2016) A nonsense mutation in the *COL7A1* gene causes epidermolysis bullosa in Vorderwald cattle. *BMC Genet.* **17**, 149.
129. Ding B., Ryder O.A., Wang X., Bai S.C., Zhou S.Q., Zhang Y. (2000) Molecular basis of albinism in the rhesus monkey. *Mutat. Res.* **449**, 1–6.
130. Johnson A.L., Peterson S.M., Terry M.M.L., Ferguson B., Colgin L.M., Lewis A.D. (2020) Spontaneous *KRT5* gene mutation in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): a novel nonhuman primate model of epidermolysis bullosa simplex. *Veterinary Pathol.* **57**, 344–348.
131. Heinonen S., Männikkö M., Klement J.F., Whitaker-Menezes D., Murphy G.F., Uitto J. (1999) Targeted inactivation of the type VII collagen gene (*Col7A1*) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Cell Sci.* **112**(Pt 21), 3641–3648.
132. Fritsch A., Loeckermann S., Kern J.S., Braun A., Bösl M.R., Bley T.A., Schumann H., von Elverfeldt D., Paul D., Erlacher M., Berens von Rautenfeld D., Hausser I., Fässler R., Bruckner-Tuderman L. (2008) A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J. Clin. Invest.* **118**, 1669–1679.
133. Kühl T., Mezger M., Hausser I., Guey L.T., Handgretinger R., Bruckner-Tuderman L., Nyström A. (2016) Collagen VII half-life at the dermal-epidermal junction zone: implications for mechanisms and therapy of genodermatoses. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1116–1123.
134. Hou Y., Guey L.T., Wu T., Gao R., Cogan J., Wang X., Hong E., Vivian Ning W., Keene D., Liu N., Huang Y., Kaftan C., Tangarone B., Quinones-Garcia I., Uitto J., Francone O.L., Woodley D.T., Chen M. (2015) Intravenously administered recombinant human type VII collagen derived from chinese hamster ovary cells reverses the disease phenotype in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mice. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3060–3067.
135. Nyström A., Velati D., Mittapalli V.R., Fritsch A., Kern J.S., Bruckner-Tuderman L. (2013) Collagen VII plays a dual role in wound healing. *J. Clin. Invest.* **123**, 3498–3509.
136. Nishie W., Sawamura D., Goto M., Ito K., Shibaki A., McMillan J.R., Sakai K., Nakamura H., Olsz E., Yancey K.B., Akiyama M., Shimizu H. (2007) Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* **13**, 378–383.
137. Luan X.-R., Chen X.-L., Tang Y.-X., Zhang J.-Y., Gao X., Ke H.-P., Lin Z.-Y., Zhang X.-N. (2018) CRISPR/Cas9-mediated treatment ameliorates the phenotype of epidermolytic palmoplantar keratoderma-like mouse. *Mol. Ther.—Nucl. Acids*. **12**, 220–228.

GENOME EDITING IN THERAPY OF GENODERMATOSES**A. V. Ivanenko¹, N. A. Evtushenko¹, and N. G. Gurskaya^{1, *}***¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia***e-mail: ngurskaya@mail.ru*

This review is devoted to the prospects for the use of fundamentally important approaches and methods for the correction and therapy of genodermatoses, a group of inherited skin diseases. The greatest number of methods was applicable for the group of inherited epidermolysis bullosa. Gene replacement using viral and non-viral methods of delivery to cells has been replaced by genome editing using programmable nucleases used both *in vitro* and *in vivo*. The focus is on more widely used methods applied *in vitro* to various cell types. The description of the methods used is classified based on the use of DNA break repair pathways: the canonical non-homologous end-reconnection pathway – cNHEJ, and directed homologous recombination – HDR. The choice of editing strategy depends on the type of mutation causing the disease, the type of its inheritance, and the nucleotide environment of the mutation. Animal disease models obtained by genome editing are considered. The experience of developing methods for editing the genome and their application for the treatment of genodermatoses, previously recognized as incurable, is summarized.

Keywords: genodermatoses, inherited epidermolysis bullosa, dominant mutation, recessive mutation, epidermal keratinocytes, induced pluripotent stem cells, programmable nucleases, genome editing, repair, recombination, transgenic cells, gene therapy, transplantation