

УДК 612.089:612.014:602.9:577.113.5:575.224

МЕТОДЫ КОРРЕКЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЗАМЕНЫ с.840С>Т В 7-М ЭКЗОНЕ ГЕНА *SMN2**

© 2019 К.Р. Валетдинова^{1,2,3,4**}, В.С. Овечкина^{1,2,3,4}, С.М. Закиян^{1,2,3,4}

¹ Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: valetdinova@bionet.nsc.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина
Минздрава России, 630055 Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 30.04.2019

После доработки 03.06.2019

Принята к публикации 03.06.2019

Технология CRISPR/Cas обладает большими перспективами в отношении лечения многих наследственных заболеваний. Среди данного типа заболеваний потенциальным кандидатом является спинальная мышечная атрофия (СМА), причина которой – делеция гена *SMN1*, кодирующего необходимый для «выживания» моторных нейронов белок SMN. В геноме пациентов присутствует от одной до нескольких копий гена-паралог *SMN2*, в 7-м экзоне которого локализована однонуклеотидная замена с.840С>Т, приводящая к нарушению сплайсинга и снижению синтеза полноразмерного белка SMN. Целью данной работы было создание и тестирование разных систем редактирования генов для коррекции однонуклеотидной замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* в фибробластах, индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) и предшественниках моторных нейронов (ПМН), полученных от пациента со спинальной мышечной атрофией. В эксперименте были использованы плазмидные векторы, обеспечивающие экспрессию компонентов системы CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, а также плаزمиды и 90-звенные одноцепочечные олигонуклеотиды в качестве донорных молекул. Доставка доноров и плазмид в клетки осуществлялась методом электропорации. Показано, что при использовании протоспейсера sgRNA_T2 в фибробластах пациента со СМА I типа система демонстрирует большую активность по сравнению с sgRNA_T1 ($p < 0,05$) и sgRNA_T3 – по сравнению с sgRNA_T1 ($p < 0,05$). При использовании sgRNA_T1, sgRNA_T2 и sgRNA_T3 в культурах пациент-специфичных ИПСК и ПМН значимых различий в эффективности редактирования последовательности 7-го экзона гена *SMN2* не обнаружено. Наибольшую эффективность в отношении коррекции замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и предшественниках моторных нейронов продемонстрировал вектор, экспрессирующий sgRNA_T1, и 90-звенные одноцепочечные олигонуклеотиды в качестве донорных молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спинальная мышечная атрофия, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, предшественники моторных нейронов, редактирование генов.

DOI: 10.1134/S0320972519090100

Одним из потенциальных методов терапии наследственных болезней является коррекция мутаций в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), полученных из соматических клеток пациента или региональных

стволовых клетках, с помощью современных систем редактирования генов и последующая аутологичная трансплантация прогениторных клеток или их дифференцированных производных с «исправленным генотипом» в организм пациента. В настоящее время компаниями CRISPR Therapeutics и Vertex проводятся клинические испытания 1/2 фазы, предусматривающие подобную терапию *ex vivo*, для таких заболеваний, как бета-талассемия и серповидноклеточная анемия, в ближайшей перспективе – миодистрофия Дюшенна и ряд других заболеваний. Однако актуальным остается вопрос – насколько эффективно использование CRISPR-

Принятые сокращения: СМА – спинальная мышечная атрофия, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ПМН – предшественники моторных нейронов.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-137, 29.07.2019.

** Адресат для корреспонденции.

опосредованных систем в отношении наследственных болезней центральной нервной системы. Среди данного типа наследственных заболеваний особое место занимает спинальная мышечная атрофия (СМА). Спинальная мышечная атрофия является одним из самых распространенных наследственных заболеваний, которые развиваются в детском возрасте, и, соответственно, одной из основных причин ранней детской смертности. Наиболее тяжелая форма данного заболевания, СМА I типа, развивается в течение первых месяцев жизни и приводит к гибели пациентов в течение двух лет [1]. Причиной этого заболевания в 95% случаев является гомозиготная делеция гена *SMN1*, который кодирует белок SMN, контролирующий различные аспекты метаболизма РНК [2]. Помимо гена *SMN1*, данный белок синтезируется с высокоомологичной копии – гена *SMN2*. Таким образом, у пациентов со СМА наблюдается уникальная ситуация, ген *SMN1* делетирован или поврежден другой мутацией, однако в геноме присутствует паралогичный ген *SMN2*, который по своей нуклеотидной последовательности практически идентичен *SMN1*. Различия между этими двумя генами сводятся к нескольким однонуклеотидным заменам, одна из замен с.840С>Т находится в 7-м экзоне и приводит к тому, что большая часть зрелых транскриптов (~90%) гена *SMN2* не содержит в своем составе 7-го экзона, в результате с такой мРНК транслируется укороченный нестабильный белок, не способный исполнять свои функции [3]. Предложено две гипотезы, которые объясняют механизм данного нарушения. Первая предполагает, что в результате мутации в 7-м экзоне гена *SMN2* прерывается последовательность экзонного энхансера сплайсинга, в результате не происходит связывание факторов сплайсинга и распознавание сайтов сплайсинга, следовательно, экзон 7 не включается в зрелую мРНК [4]. Вторая гипотеза предполагает, что образуется экзонный сайленсер сплайсинга, который препятствует включению 7-го экзона в зрелую мРНК [5]. В силу нестабильности данного района, количество копий гена *SMN2* может значительно варьировать. Чем больше копий *SMN2* в геноме, тем больше полноразмерного белка, и, соответственно, легче проявление симптомов заболевания. Было показано, что число копий гена *SMN2* коррелирует с тяжестью СМА [6]. Большинство пациентов со спинальной мышечной атрофией I типа имеют две копии гена *SMN2*, больные СМА II типа имеют три копии гена *SMN2*, при СМА III типа обнаруживается три или четыре копии *SMN2*. В группе условно здоровых людей в среднем присутствует 1–2 копии гена *SMN2*.

Несмотря на то что за последнее десятилетие было получено много новых знаний, касающихся патогенеза и молекулярной генетики данного заболевания, патогенетическая терапия для СМА появилась относительно недавно. В 2017 году в США и странах ЕС было одобрено первое лекарство от СМА, которое представляет собой антисмысловую олигонуклеотид, обеспечивающий модуляцию сплайсинга *SMN2* [7]. Однако для достижения необходимого терапевтического эффекта необходимы постоянные интратекальные инъекции данного препарата, поскольку с течением времени он разрушается клеточными системами. Кроме того, препарат обеспечивает лишь облегчение симптомов, и соответственно, некоторое увеличение продолжительности жизни пациентов, долговременные эффекты применения данного препарата не изучены. Единственным потенциальным способом этиотропной терапии данного заболевания на сегодняшний день является коррекция замены с.840С>Т в паралогичном гене.

Целью данной работы являлось создание и тестирование CRISPR-опосредованных систем для коррекции однонуклеотидной замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* в фибробlastах, индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и предшественниках моторных нейронов. Первоочередной задачей являлось внесение двуцепочечного разрыва в непосредственной близости от данной замены, поскольку для эффективной рекомбинации расстояние между разрывом ДНК и участком, в котором локализована целевая замена, не должно превышать 20 нуклеотидов [8]. Для этого были подобраны направляющие РНК для системы CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, которые вносят двуцепочечные разрывы максимально близко к целевой замене, обеспечивая тем самым увеличение частоты гомологичной рекомбинации. Также был разработан дизайн донорных молекул, включающих как плазмидный вектор с селекционной кассетой, так и короткие одноцепочечные олигонуклеотиды.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Плазмидные конструкции. Карты плазмидных векторов pX552_miCMV_Puro_SMN, pUC19_SMN2_contr и pUC19_SMN2_mut были построены с помощью программного обеспечения SnapGene. Для сборки использовали амплифицированные фрагменты ДНК генов *SMN1* и *SMN2*, фрагменты 615–818 п.н. плазмиды pcDNA 3.1(-) («Invitrogen», США), 6775–7374 п.н. плазмиды w-159-1, которая была любезно предоставлена Е. Camreau и Р. Kaufman

(Addgene plasmid # 17481). Плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) и pY010 любезно предоставлены F. Zhang (Addgene plasmid # 48138 и # 69982), pTE4560 любезно предоставлена E. Welker (Addgene plasmid # 107526). Амплификацию фрагментов ДНК проводили с применением полимеразы Phusion Hot Start II («Thermo Fisher Scientific», США) на амплификаторе C-1000 («Bio-Rad», США). Праймеры использованные в работе, указаны в табл. 1. Сборку плазмид осуществляли с применением классических методов молекулярного клонирования, а также с использованием метода Golden Gate («NEB», США). Плазмидные клоны секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser («Applied Biosystems», США) в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью PureLink High Pure Plasmid Midiprep («Invitrogen», США).

Дизайн направляющих РНК и донорных молекул. Дизайн направляющих РНК и донорных молекул осуществлялся с помощью онлайн-ресурса <http://benchling.com>.

Культивирование фибробластов, ИПСК. В работе использовались фибробласты f1SMA и две линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi005-A и ICGi005-B от пациента со SMA I типа, охарактеризованные ранее [9]. Фибробласты культивировались в среде DMEM/F-12 с добавлением 10% FBS, 0,1мМ NEAA, 1 мМ GlutaMax, 100x Pen/Strep («Gibco», США). Клетки пересаживали в соотношении 1:3 каждые 5 дней с помощью реагента TrypLE («Gibco», США). ИПСК культивировали в среде KnockOut DMEM с добавлением 15% KnockOut Serum Replacement, 0,1мМ NEAA, 1 мМ GlutaMax, 100x Pen/Strep («Gibco», США), 2-mercapthoethanol («Sigma», США) и 10 нг/мл bFGF («BioLegend», США). Клетки пересаживали дважды в неделю в соотношении 1:10 с помощью реагента TrypLE.

Получение и культивирование ПМН. Дифференцировка ИПСК до стадии предшественников моторных нейронов (ПМН) проводили согласно протоколу Du et al., [10] 2014. Клетки пересаживали с помощью фермента Accutase («Gibco», США) в соотношении 1:3–1:4 дважды в неделю.

Трансфекция фибробластов, ИПСК и ПМН. Трансфекцию ИПСК и фибробластов проводили на приборе Neon Transfection System («Thermo Fisher Scientific», США) согласно инструкции производителя. Использовали 5 мкг плазмидной ДНК на 500 тыс. клеток, или 3 мкг плазмидной ДНК и 2 мкл 100 мкМ донорного олигонуклеотида.

Сортировка клеток. Сортировку клеток проводили на приборе S3e Cell Sorter («Bio-Rad», США) через 48 ч после трансфекции.

Выделение ДНК и ПЦР. Выделение геномной ДНК проводили с помощью Quick-DNA Miniprep Kit («Zymo Research», США), очистку продуктов ПЦР осуществляли с использованием набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit («Zymo Research», США). Амплификацию фрагментов ДНК проводили с применением набора BioMaster HS-Taq PCR-Color 2x («Biolabmix», Россия) на амплификаторе C-1000. Условия проведения ПЦР: 95 °C – 5 мин, 35 циклов: 95 °C – 30 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, далее 72 °C – 5 мин. Праймеры указаны в табл.1.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. РНК из культур клеток выделяли с помощью TRIzol Reagent («Thermo Fisher Scientific», США), согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с использованием Super Script III Reverse Transcriptase («Thermo Fisher Scientific», США). ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2x («Biolabmix», Россия) на амплификаторе LightCycler 480 («Roche», Германия) в течение 40 циклов. Каждый цикл состоял из двух стадий: 95 °C – 15 с, 60 °C – 1 мин. Значения C_T были нормализованы на *GAPDH* с использованием $\Delta\Delta C_T$ -метода.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили согласно протоколу: фиксация в 4%-ном растворе формальдегида («Sigma», США) в течение 15 мин при комнатной температуре, пермеабилзация в 0,5% (v/v) Triton-X100 («Sigma», США) 30 мин при комнатной температуре, блокировка в 1%-ном BSA («Sigma», США) 30 мин. Инкубацию с первичными антителами к OLIG2 (AB9610, разведение 1:500) («EMD Milipore», США) проводили в течение 16 ч при 4 °C, со вторичными – Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (H+L) (A11011, разведение 1 : 400) («Thermo Fisher Scientific», США) 1,5–2 ч при комнатной температуре. DAPI («Sigma», США) был использован для окраски ядер. Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе NIS-Elements Eclipse Ti-E («Nikon», Япония).

Анализ целевой и нецелевой активности CRISPR-систем. Оценку эффективности редактирования целевых и нецелевых последовательностей CRISPR-системами проводили с помощью алгоритма TIDE (для инсерций/делеций) и TIDeR (для однонуклеотидной замены с.840C>T в 7-м экзоне гена *SMN2*).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проведена в программе STATISTIC 10.0 с использованием критерия

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Название	Ген	Последовательность 5'→3', назначение
GA_F2	<i>SMN2</i>	AAGTGATTCTCCTGCCTCAACC детекция целевой встройки, TIDE, TIDER
GA_R1	<i>SMN2</i>	CACAACCAACCAGTTAAGTATGAG детекция целевой встройки, TIDE, TIDER
NT1_F	<i>LOC105376917</i>	TAGGTAACACAAAGSTCATCCC детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT1_R	<i>LOC105376917</i>	AGAGAAGCCAGTTCCCTCTA детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT5_F	<i>LOC105369801</i>	GCCAGTATACTAGATGGCCTAGA детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT5_R	<i>LOC105369801</i>	TCCTTCAGCCTGGTCCSTAAA детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT2_F	<i>PRPS2</i>	GGTACAGGTGATCTCTCCTTTG детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT2_R	<i>PRPS2</i>	GCACAGTAACCAAGATGGTTTATC детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT3_F	<i>FANCD2</i>	CAGCCTGCTGTTTGTTCAG детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT3_R	<i>FANCD2</i>	GGAAACTGCCTAGAGGTAGAAG детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT4_F	<i>FANCD2P2</i>	CTATGTCCCTCCTCTTGAAAAC детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT4_R	<i>FANCD2P2</i>	TGCTTAGCAGTAGAAGAGGTAAT детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT6_F	<i>LIN28B</i>	CCCTTAAGGATACGAGGTGAAA детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
NT6_R	<i>LIN28B</i>	GGGAGGTAATGCCCAGTATT детекция нецелевых эффектов с помощью TIDE
GA_Hind_F	<i>SMN2</i>	CCTAAGCTTAAGTGATTCTCCTGCCTCAACC клонирование <i>SMN2</i> в pUC19_ <i>SMN2_contr</i>
GA_Xba_R	<i>SMN2</i>	GTTTC-TAGAC-ACAAC-CAACC-AGTTA-AGTAT-GAG клонирование <i>SMN2</i> в pUC19_ <i>SMN2_contr</i>
BsmBI_F	<i>SMN2</i>	TATCGTCTCTACAGGGTTTCAGACAAAAT внесение замены T>C в pUC19_ <i>SMN2_mut</i>
BsmBI_R	<i>SMN2</i>	GTCCGTCTCCCTGTAAGGAAAATAAAG внесение замены T>C в pUC19_ <i>SMN2_mut</i>
AflII_F	<i>SMN2</i>	GCCCTAAGGTTAATGTA AAAAC клонирование 3'-плеча в pX552_miCMV_Puro_ <i>SMN</i>
HindIII_R	<i>SMN2</i>	GCCAAGCTTCCATTCCACTTCCT клонирование 3'-плеча в pX552_miCMV_Puro_ <i>SMN</i>
Pci_SMN1	<i>SMN2</i>	GCCACATGTTTAAATTTTTGTAGAGAC клонирование 5'-плеча в pX552_miCMV_Puro_ <i>SMN</i>

Название	Ген	Последовательность 5'→3', назначение
AgeI_SMN1	<i>SMN2</i>	CATACCGGTTTTTTAAATGTTCAAAAAC клонирование 5'-плеча в pX552_miCMV_Puro_SMN
BbsI_Lys_Gln_F	<i>SMN2</i>	ACAGAAGACCAGACAAAATCAAAAGGAAGG внесение синонимичных замен для протоспейсера sgRNA_T2 в pX552_miCMV_Puro_SMN
BbsI_Lys_Gln_R	<i>SMN2</i>	CTTGAAGACTTTGTCTGAAAACCTGTAAGGAAAAATAAAG внесение синонимичных замен для протоспейсера sgRNA_T2 в pX552_miCMV_Puro_SMN
NheI_PuroR_F	<i>PuroR</i>	CAGGCTAGCATGACCGAGTAC клонирование гена устойчивости к пурамицину в pX552_miCMV_Puro_SMN
PuroR_R_KpnI	<i>PuroR</i>	GGGGGTACCTCAGGCACCGG клонирование гена устойчивости к пурамицину в pX552_miCMV_Puro_SMN
miCMV_PacI	–	GGCTTAATTAAGCGATCTGACG клонирование промотора miCMV в pX552_miCMV_Puro_SMN
PacI_miCMV	–	GGCTTAATTAACGGTTTGACTC клонирование промотора miCMV в pX552_miCMV_Puro_SMN
Cpf10_S	<i>SMN2</i>	AGATGGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGT клонирование sgRNA_T6 в pTE4560
Cpf10_AS	<i>SMN2</i>	AAAAACCTTCCTTCTTTTTGATTTGTCC клонирование sgRNA_T6 в pTE4560
Cpf7_S	<i>SMN2</i>	AGATGCCTTACAGGGTTTTAGACAAAATC клонирование sgRNA_T5 в pTE4560
Cpf7_AS	<i>SMN2</i>	AAAAGATTTTGTCTAAAACCCTGTAAGGC клонирование sgRNA_T5 в pTE4560
Cpf2_S	<i>SMN2</i>	AGATGGTCTAAAACCCTGTAAGGAAAATA клонирование sgRNA_T4 в pTE4560
Cpf2_AS	<i>SMN2</i>	AAAATATTTTCTTACAGGGTTTTAGACC клонирование sgRNA_T4 в pTE4560
SMN2_T1_1	<i>SMN2</i>	CACCGATTTTGTCTAAAACCCTGTA клонирование sgRNA_T1 в pX458
SMN2_T1_2	<i>SMN2</i>	AAACTACAGGGTTTTAGACAAAATC клонирование sgRNA_T1 в pX458
SMN2_T2_1	<i>SMN2</i>	CACCGTTTAGACAAAATCAAAAAGA клонирование sgRNA_T2 в pX458
SMN2_T2_2	<i>SMN2</i>	AAACTCTTTTGTATTTGTCTAAAC клонирование sgRNA_T2 в pX458
SMN2_T3_1	<i>SMN2</i>	CACCGGACAAAATCAAAAAGAAGGA клонирование sgRNA_T3 в pX458
SMN2_T3_2	<i>SMN2</i>	AAACTCCTTCTTTTTGATTTTGTCC клонирование sgRNA_T3 в pX458
GAPDH_S	<i>GAPDH</i>	CGCCAGCCGAGCCACATC ОТ-ПЦР в реальном времени
GAPDH_AS	<i>GAPDH</i>	CGCCCAATACGACCAAATCC-G ОТ-ПЦР в реальном времени

Название	Ген	Последовательность 5'→3', назначение
NANOG_S	<i>NANOG</i>	ATGGAGGAAGGAAGAGGAGA ОТ-ПЦР в реальном времени
NANOG_AS	<i>NANOG</i>	GATTTGTGGGCCTGAAGAAA ОТ-ПЦР в реальном времени
PAX6_RT_F	<i>PAX6</i>	TCCGTTGGAАСТGATGGAGT ОТ-ПЦР в реальном времени
PAX6_RT_R	<i>PAX6</i>	GTTGGTATCCGGGGACTTC ОТ-ПЦР в реальном времени
OLIG2_RT_F	<i>OLIG2</i>	GATAGTCGTCGCAGCTTTTCG ОТ-ПЦР в реальном времени
OLIG2_RT_R	<i>OLIG2</i>	CCTGAGGCTTTTCGGAGC ОТ-ПЦР в реальном времени

Вилкоксона и однофакторного дисперсионного анализа. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн конструкций. В результате биоинформатического анализа последовательности 6-го интрона и 7-го экзона гена *SMN2* было выбрано 3 протоспейсера для системы CRISPR/Cas9 (sgRNA_T1, sgRNA_T2, sgRNA_T3) и 3 протоспейсера для системы CRISPR/Cpf1 (sgRNA_T4, sgRNA_T5, sgRNA_T6), которые локализованы в пределах 20 нуклеотидов от замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* (рис. 1). Выбор был обусловлен тем, что система CRISPR/Cas9 вносит двунитевые разрывы с «тупыми» концами, CRISPR/Cpf1 – с «липкими» концами, а эффективность рекомбинации разного типа разрывов может отличаться. Кроме того, выбранные протоспейсеры комплементарны разным цепям ДНК, что также имеет значение, поскольку показано, что эффективность репарации по типу соединения негомологичных концов при использовании направляющих РНК, комплементарных матричной и кодирующей цепям ДНК, отличается [11].

Дизайн плазмидного донорного вектора pX552_miCMV_Puro_SMN, обеспечивающего гомологичную рекомбинацию в гене *SMN2*, был разработан следующим образом (рис. 2, а): гомологичные к участкам по обеим сторонам от разрыва ДНК-последовательности (так называемые 5'- и 3'-плечи гомологии) фланкировали

селекционную кассету в виде гена устойчивости к пурамицину. Однонуклеотидная замена Т→С находилась в 5'-плече гомологии, а селекционная кассета располагалась таким образом, что после рекомбинации она должна была оказаться в 7-м интроне гена *SMN2*. Для предотвращения повторного узнавания и разрезания системой CRISPR/Cas9 в участок, непосредственно прилегающий к PAM (3'-область протоспейсера, «seed region»), были внесены дополнительные синонимичные однонуклеотидные замены для каждого из протоспейсеров sgRNA_T1, sgRNA_T2, sgRNA_T3. При этом в случаях, где это было возможно, принимались во внимание частоты встречаемости соответствующих кодонов. Таким образом, в 5'-плече гомологии, помимо целевой замены Т→С, содержались дополнительные замены:

- для Т1 ТСС→АГС (Сер, частоты встречаемости 17,7 и 19,4 соответственно) и ТТА→СТА (Лей, частоты встречаемости 7,6 и 7,1);
- для Т2 ААА→ААГ (Лиз, частоты встречаемости 24,2 и 32,0) и САА→САГ (Глн, частоты встречаемости 12,1 и 34,2);
- для Т3 СГА→АГА (Арг, частоты встречаемости 6,2 и 11,9) и ГГА→ГГГ (Гли, частоты встречаемости 16,4 и 16,5).

Аmplифицированные участки были клонированы в плазмидный вектор, длина плеч гомологии составила ~500 п.н., что, согласно литературным данным, является оптимальной длиной для прохождения гомологичной рекомбинации [8].

Дизайн олигонуклеотидного донора был выбран следующим образом: 90-звенный одно-

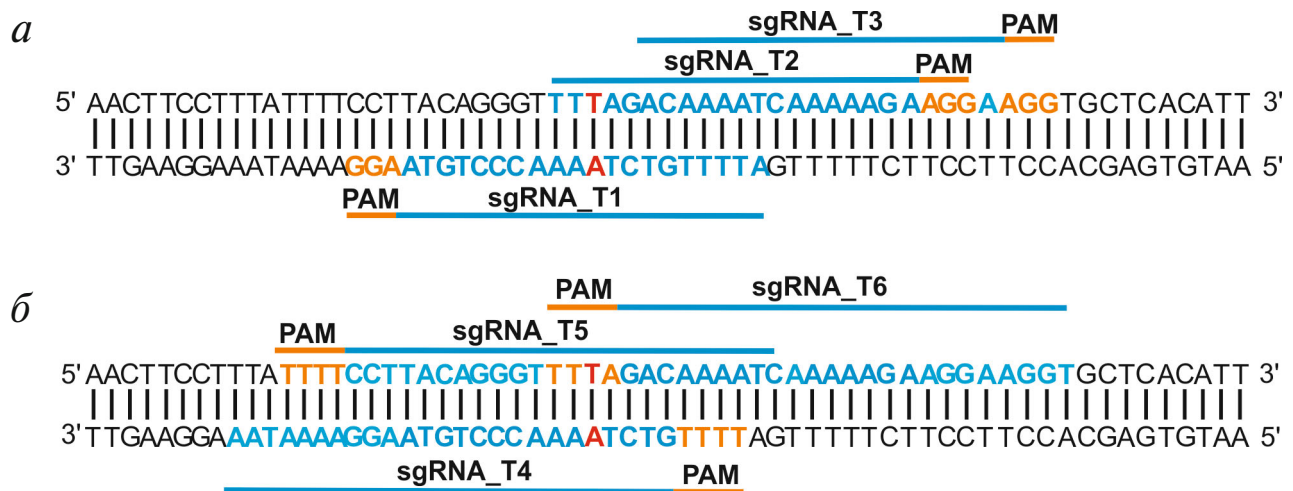


Рис. 1. Дизайн направляющих РНК в 7-м экзоне гена *SMN2*. *a* – Расположение направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9. *б* – Расположение направляющих РНК для системы CRISPR/Cpf1. Замена с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* выделена красным цветом. Последовательности PAM, необходимые для распознавания мишени системами CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, выделены оранжевым цветом

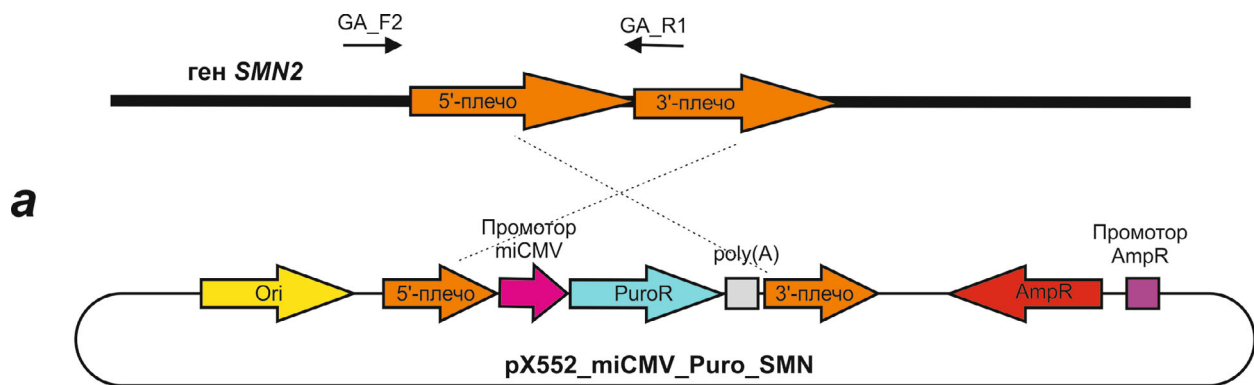


Рис. 2. *a* – Схема донорного вектора pX552_miCMV_Puro_SMN. GA_F2 и GA_R – праймеры, используемые для детекции встройки селекционной кассеты. *б* – Одноцепочечные донорные олигонуклеотиды. Замена с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* выделена красным цветом

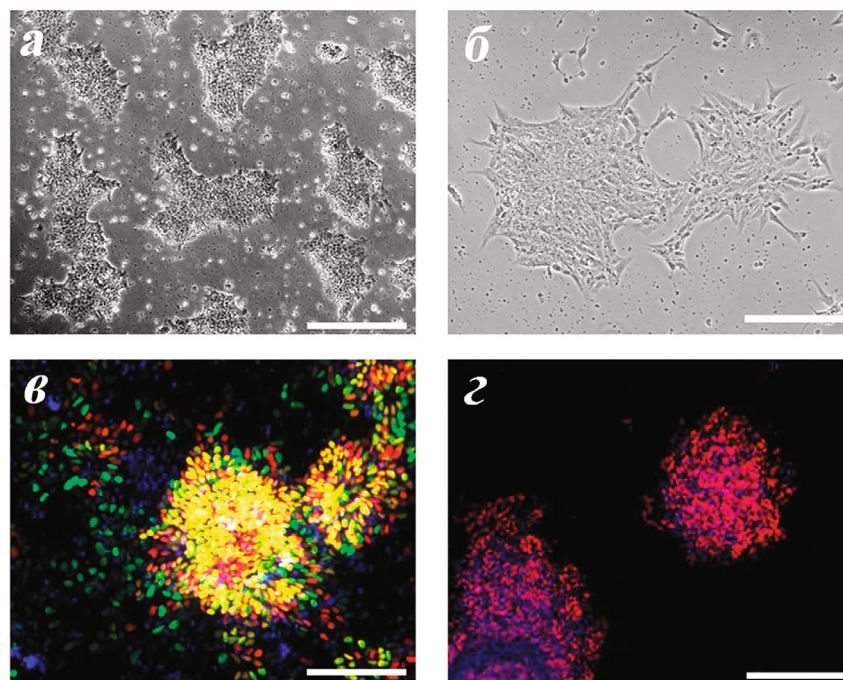


Рис. 3. Дифференцировка ИПСК в направлении ПМН. *а* – ИПСК ICGi005-А на 0 день дифференцировки. *б* – ПМН на 12 день дифференцировки. *в* – Экспрессия маркеров нейроэпителиальных предшественников PAX6 (красный) и SOX1 (зеленый) на 6 день дифференцировки. *г* – Экспрессия маркера ПМН OLIG2 (красный) на 12 день дифференцировки. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка 200 мкм

цепочечный олигонуклеотид, комплементарный либо матричной цепи (SMN1_S), либо кодирующей цепи ДНК (SMN1_AS). Замена Т→С находилась примерно в центре последовательности донорного олигонуклеотида (рис. 2, б).

Получение ПМН. В процессе дифференцировки ИПСК (рис. 3, *а*) ICGi005-А в направлении предшественников моторных нейронов (рис. 3, *б*) показано снижение экспрессии одного из основных маркеров плюрипотентных клеток гена *NANOG*, в то же время отмечено увеличение экспрессии маркера нейроэпителиальных клеток гена *PAX6* на 6-й и 12-й день дифференцировки и транскрипционного фактора ПМН *OLIG2* на 12-й и 18-й день дифференцировки (рис. 4). На 18-й день дифференцировки экспрессия *PAX6* вновь снижается, поскольку к этому дню большая часть нейроэпителиальных клеток достигает стадии предшественников моторных нейронов, о чем свидетельствует более чем 500× увеличение экспрессии *OLIG2*. С помощью иммуноцитохимического анализа также показана экспрессия основных маркеров нейроэпителия – белков PAX6 и SOX1, а также маркера ПМН – OLIG2 (рис. 3, *в* и *г*).

Преимуществом использования ПМН является то, что эти клетки можно культивировать в течение 10 пассажей и более, при этом они сох-

раняют значительную пролиферативную активность, а также экспрессию *OLIG2*, и, следовательно, способность к дальнейшей дифференцировке в направлении зрелых моторных нейронов, которые являются основным типом клеток, страдающих при спинальной мышечной атрофии.

Сравнительная оценка эффективности работы CRISPR-опосредованных систем в гене *SMN2*. Для оценки эффективности работы системы CRISPR/Cas9 в гене *SMN2* фибробласты пациента со спинальной мышечной атрофией I типа f1SMA, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки ICGi005-А, полученные из фибробластов данного пациента, а также предшественники моторных нейронов данной клеточной линии были трансфицированы плазмидой рХ458. Данный вектор обеспечивал в клетках экспрессию белка Cas9 и одной из направляющих РНК sgRNA_T1, sgRNA_T2, sgRNA_T3, а также зеленого флуоресцентного белка GFP.

После репарации двуцепочечных разрывов ДНК путем соединения негомологичных концов формируются небольшие инсерции и делеции, по количеству которых можно судить об эффективности работы CRISPR-системы. Одним из наиболее простых и надежных инструментов количественной оценки эффективности

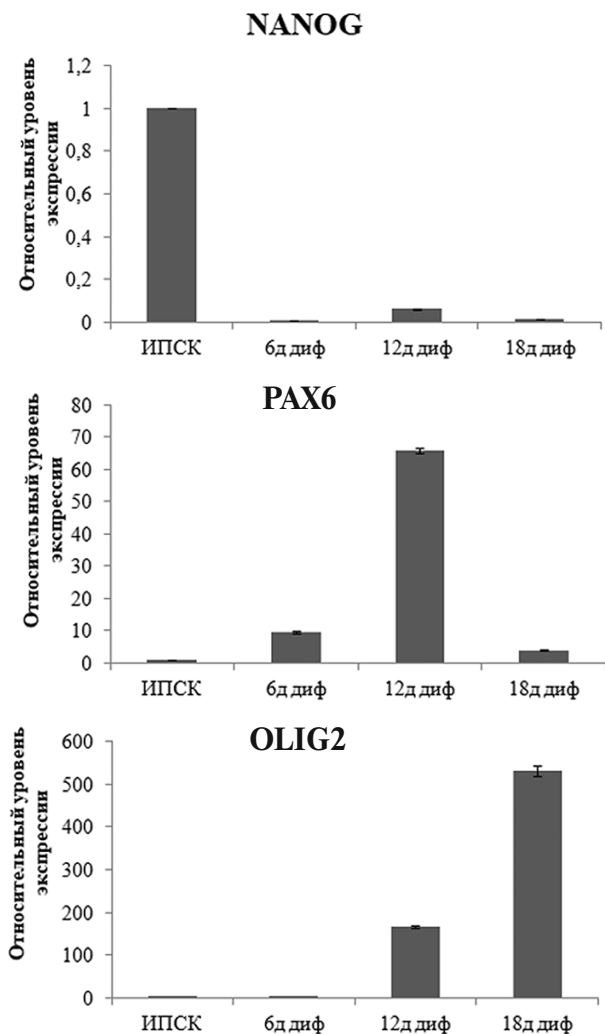


Рис. 4. Экспрессия генов *NANOG*, *PAX6* и *OLIG2* в процессе дифференцировки ИПСК в ПМН

редактирования генов является анализ секвеннограмм продуктов ПЦР, полученных после воздействия на клетки CRISPR-системы, с помощью онлайн-ресурса TIDE [12]. Продукты ПЦР, полученные из всех экспериментальных образцов ДНК, были секвенированы по Сэнгеру и проанализированы с использованием TIDE (рис. 5). В результате было показано, что при использовании спейсера *sgRNA_T2* в фибробlastах пациента со СМА I типа система демонстрирует большую активность по сравнению с *sgRNA_T1* ($p < 0,05$), и *sgRNA_T3* – по сравнению с *sgRNA_T1* ($p < 0,05$). При использовании *sgRNA_T1*, *sgRNA_T2* и *sgRNA_T3* в культурах пациент-специфичных ИПСК и ПМН значимых различий в эффективности редактирования последовательности 7-го экзона гена *SMN2* не обнаружено. При сравнении суммарной активности CRISPR/Cas9 в 7-м экзоне гена *SMN2* в

разных клеточных типах показано, что в фибробlastах и ИПСК эффективность редактирования выше, чем в предшественниках моторных нейронов ($p < 0,05$). Наибольшую активность в 7-м экзоне гена *SMN2* в фибробlastах, ИПСК и ПМН система CRISPR/Cas9 проявляет при использовании *sgRNA_T2* (различия на уровне тенденции, $p = 0,097$).

Для оценки эффективности работы системы CRISPR/Cpf1 в гене *SMN2* ИПСК ICGi005-A и ПМН, полученные в результате направленной дифференцировки данной клеточной линии, были трансфицированы плазмидой pY010, обеспечивающей экспрессию белка Cpf1, и плазмидой pTE4560, обеспечивающей экспрессию одной из направляющих РНК *sgRNA_T4*, *sgRNA_T5*, *sgRNA_T6*, а также красного флуоресцентного белка mCherry. При анализе эффективности работы конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cpf1, показано, что значимых различий в эффективности редактирования последовательности *SMN2* при использовании *sgRNA_T4*, *sgRNA_T5*, *sgRNA_T6* в ИПСК и ПМН не наблюдается. Однако в ИПСК CRISPR/Cpf1 работает с большей активностью, чем в ПМН ($p < 0,05$).

Сравнительная оценка нецелевой активности выбранных протоспейсеров. Чтобы определить,

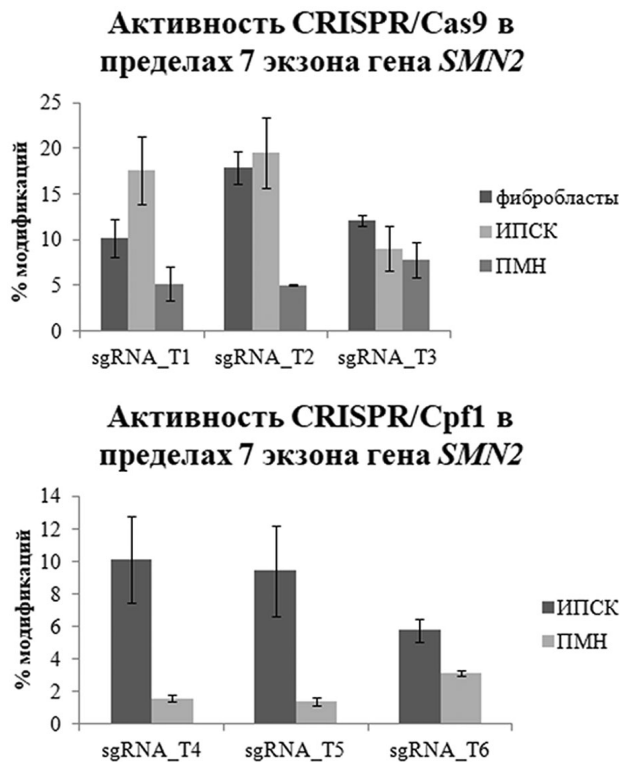


Рис. 5. Эффективность работы CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1 в 7-м экзоне гена *SMN2* по данным TIDE

какой из выбранных протоспейсеров имеет наименьшее число нецелевых сайтов в геноме, был проведен биоинформатический анализ. Современные биоинформатические инструменты для определения потенциальных нецелевых сайтов действия системы CRISPR/Cas9 используют разные алгоритмы. При их сравнении было показано, что, хотя определенные различными инструментами протоспейсеры для CRISPR/Cas9 на заданном участке генома совпадают, количество выявленных потенциальных нецелевых сайтов может различаться [13]. Также стоит отметить, что большинство этих инструментов выявляет нецелевые сайты, содержащие однонуклеотидные замены относительно канонического сайта, однако в нескольких работах было показано, что нецелевые двуцепочечные разрывы могут происходить также в сайтах, содержащих инсерции или делеции [14, 15]. В данной работе, ввиду приведенных выше факторов, для выявления потенциальных нецелевых сайтов были использованы несколько доступных в настоящее время биоинформатических инструментов: Cas-OFFinder и COSMID. В качестве входных данных для программного обеспечения были взяты последовательности протоспейсеров sgRNA_T1, sgRNA_T2, sgRNA_T3, sgRNA_T4, sgRNA_T5, sgRNA_T6, а также полный геном человека.

Каждый алгоритм позволяет выявить нецелевые сайты, содержащие как замену нуклеотида, так и инсерции и делеции относительно последовательности протоспейсера, однако Cas-OFFinder показывает их общее количество и не ранжирует замены по вероятности их возникновения. Известно, что наиболее вероятно связывание CRISPR/Cas9 с сайтами, замены в которых расположены в 5'-области протоспейсера, а замены в 3'-области препятствуют узнаванию участка ДНК в качестве потенциальной мишени для работы системы [16]. Это программное обеспечение больше подходит для использования в качестве инструмента для быстрого выявления и сравнения общего количества нецелевых сайтов и замен в них, что также позволяет оценивать специфичность выбранного спейсера CRISPR/Cas9 [13]. С помощью данного инструмента было определено общее количество нецелевых сайтов с минимальным количеством замен, равным 3. Для протоспейсера sgRNA_T1 оно составило 24, для sgRNA_T2 – 72, а для sgRNA_T3 – 115. Если не учитывать характер замен в нецелевых сайтах, то, согласно результатам данного анализа, более безопасно использовать протоспейсер sgRNA_T1, так как для него общее число нецелевых сайтов меньше, чем для протоспейсеров sgRNA_T2 и sgRNA_T3.

Алгоритм COSMID в результате поиска и анализа нецелевых сайтов также присваивает каждому сайту ранг – чем меньше ранг, тем выше вероятность возникновения нецелевого эффекта (у целевого сайта ранг 0,00). В результате анализа был получен список наиболее вероятных нецелевых сайтов в геноме, содержащих не более 4-х замен и/или инсерций или делеций не более 2-х нуклеотидов. Наименьшее количество нецелевых сайтов обнаружено для sgRNA_T1, наибольшее – для sgRNA_T3. Однако большинство потенциальных мишеней нецелевой активности CRISPR/Cas9 имели очень высокий ранг и были расположены в некодирующих участках генома и межгенных промежутках. Поэтому из полученного списка были выбраны только те сайты, которые расположены в кодирующих районах (табл. 2). Затем с помощью TIDE была проанализирована активность системы CRISPR/Cas9 в этих сайтах в экспериментальных образцах фибробластов, ИПСК и ПМН, описанных в предыдущей части. В результате не было обнаружено инсерций/делеций в этих участках ДНК.

Аналогичная работа была проведена и для оценки потенциальной нецелевой активности протоспейсеров CRISPR/Cpf1. Нецелевая активность данной системы значительно ниже, чем у CRISPR/Cas9, поскольку направляющая РНК у CRISPR/Cpf1 длиннее. С помощью Cas-OFFinder для протоспейсера sgRNA_T4 было обнаружено 3 потенциальных нецелевых сайта в геноме, для sgRNA_T5 – 0, для sgRNA_T6 – 5 сайтов. Нецелевых сайтов в кодирующих областях генома не обнаружено, поэтому экспериментальной оценки нецелевой активности в наиболее вероятных сайтах генома не проводилось.

Таким образом, наиболее оптимальными в отношении потенциальной нецелевой активности являются протоспейсеры sgRNA_T1 и sgRNA_T2 в случае использования системы CRISPR/Cas9 и любой из протоспейсеров CRISPR/Cpf1.

Оценка эффективности работы CRISPR-опосредованных систем по коррекции однонуклеотидной замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена SMN2. Для того, чтобы оценить насколько эффективно полученная система способна вносить однонуклеотидную замену Т>С в 7-й экзон гена SMN2, была проведена трансфекция фибробластов f1SMA плазмидой рХ458, экспрессирующей Cas9 и sgRNA_T2, и донорной плазмидой рХ552_miCMV_Puro_SMN1. Через 48 ч после трансфекции, с помощью клеточного сортера, проводили отбор клеток, в которых экспрессировался белок GFP (а значит и компоненты системы CRISPR/Cas9). Через 48 ч после данной процедуры в культуральную среду добавляли пу-

Таблица 2. Сайты нецелевой активности CRISPR/Cas9 в кодирующих участках генома

Протоспейсер	Ген	Расположение	PAM	Последовательность
sgRNA_T1	<i>LOC105376917</i> <i>PRPS2</i>	chr19:-22494728 chrX:+12823219	GAG	AATATGTTTAAACCCTGTA
			TAG	CATTTGGGTAAAACCCTGTA
sgRNA_T2	<i>FANCD2</i> <i>FANCD2P2</i>	chr3:+10072949 chr3:+11891166	AAG	TTCAGCAAAAATCAGAAAGA
			GAG	TTCAGCAAAAATCAGAAAGA
sgRNA_T3	<i>LOC105369801</i> <i>LIN28B</i>	chr12:+64010927 chr6:+104957098	AAG	TATAAAATCAAAAGGAAGGA
			AAG	AAAAAAATCAAAAAGAAGGA

Примечание. Замены в сайте нецелевой активности выделены серым цветом.

ромицин в концентрации 850 нг/мл в течение 4-х суток, чтобы отобрать клетки, в которых произошла встройка селекционной кассеты, а, следовательно, и гомологичная рекомбинация. В случае встройки селекционной кассеты, при проведении ПЦР с праймерами, один из которых находится за пределами 5'-плеча гомологии, а второй в пределах 3'-плеча гомологии, продукт ПЦР получился бы длиннее на величину селекционной кассеты (1664 п.н. вместо 850 п.н.). Однако при ПЦР-анализе смешанной популяции, полученной после селекции, были обнаружены только продукты дикого типа (рис. 6). При анализе продуктов дикого типа с помощью инструмента TIDE показано, что эффективность редактирования (оцененная по количеству инсерций/делений) составила 27,7%.

С учетом полученных данных следующий эксперимент был проведен аналогичным образом, но уже с использованием ИПСК ICGi005-A. При этом селекция была проведена в два раунда с использованием пурамицина в концентрации 250 нг/мл. Полученные субклоны и смешанная клеточная популяция были проанализированы по отдельности. По результатам ПЦР смешанной популяции и отдельных субклонов, полученных после селекции, были обнаружены только продукты дикого типа (рис. 6). При ана-

лизе смешанной популяции с помощью TIDE показано, что эффективность редактирования составила 23%.

В связи с неоднозначными результатами, полученными в экспериментах с плазмидным донорным вектором, было принято решение использовать в качестве донора короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, содержащие целевую однонуклеотидную замену. Аналогичный эксперимент был проведен с использованием вектора, обеспечивающего экспрессию протоспейсера sgRNA_T1, и олигонуклеотида SMN_AS/SMN_S в антисмысловой и смысловой последовательности. По данным TIDER, среднее количество замен T>C в целевом локусе при использовании олигонуклеотида SMN_S составило $13,7 \pm 1,7\%$. При использовании антисмысловой последовательности донорного олигонуклеотида SMN_AS количество целевых замен составило $15,25 \pm 0,35\%$. В аналогичном эксперименте с предшественниками моторных нейронов получились сопоставимые значения эффективности редактирования: в случае смысловой последовательности – $15,9 \pm 2,40\%$; в случае антисмысловой последовательности – $16,35 \pm 1,34\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была проанализирована активность двух систем CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1 в пределах 7-го экзона гена *SMN2* в фибробластах, ИПСК и ПМН, полученных от пациента со спинальной мышечной атрофией. Несмотря на то что протоспейсеры sgRNA_T1 и sgRNA_T2/sgRNA_T3 были комплементарны матричной и кодирующей цепям ДНК соответственно, значимые различия в эффективности

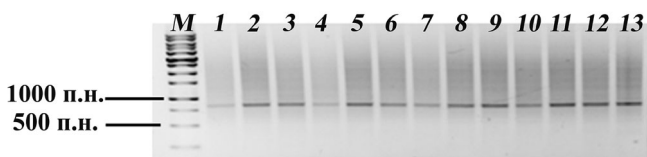


Рис. 6. ПЦР-анализ на наличие встройки селекционной кассеты. М – Маркер, 1 – смешанная популяция фибробластов f1SMA, 2 – смешанная популяция ИПСК ICGi005-A, 3–13 – субклоны ИПСК ICGi005-A

их использования были обнаружены только в фибробластах. В ИПСК и ПМН, которые представляют наибольший интерес в дальнейшей работе ввиду того, что они являются источником моторных нейронов, значимых различий в эффективности репарации по типу соединения негомولوجичных концов при использовании разных направляющих РНК обнаружено не было. Однако при сравнении активности CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1 в разных клеточных типах, показано, что в ПМН эффективность редактирования значимо ниже, чем в ИПСК. По всей вероятности, это объясняется особенностями данного типа клеток, либо же использованный метод доставки путем электропорации плазмидных конструкций не являлся наиболее оптимальным для данного типа клеток.

При оценке потенциальных сайтов нецелевой активности показано, что наибольший риск нецелевых эффектов имеет протоспейсер sgRNA_T3: в геноме присутствуют два участка в генах *LIN28B* и *LOC105369801*, которые отличаются лишь на 3 основания от последовательности-мишени, причем 2 основания расположены в 5'-области протоспейсера. При использовании же протоспейсеров sgRNA_T1 и sgRNA_T2 вероятность повреждения кодирующих районов довольно низкая, что и было подтверждено в эксперименте. В случае использования системы CRISPR/Cpf1 вероятность повреждения нецелевых сайтов значительно ниже. Кроме того, снижения нецелевой активности можно добиться введением модифицированных вариантов Cas9, а также использованием не плазмидных векторов, а короткоживущих в клетке РНК-белковых комплексов sgRNA-Cas9 [8].

Поскольку область применения инструментов редактирования генома человека относится к персонализированной медицине, то при выборе потенциальных мишеней для CRISPR/Cas9 следует учитывать генетические полиморфизмы. При анализе использованных в работе протоспейсеров с помощью ресурса CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) с использованием версии генома человека hg19 обнаружено, что один из полиморфизмов (замена G на C) «убивает» РАМ, прилегающий к самому эффективному прото-

спейсеру sgRNA_T2, и, будучи в критичной области, скорее всего, делает не активным sgRNA_T3. Частота встречаемости данного полиморфизма составляет ~1%. Соответственно, в данном случае для коррекции однонуклеотидной замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* может быть использован только протоспейсер sgRNA_T1.

В проведенных экспериментах по коррекции однонуклеотидной замены с.840С>Т в 7-м экзоне гена *SMN2* использование кольцевого донорного вектора продемонстрировало высокую вероятность нецелевых встроек и низкую – целевых. Вероятно, это обусловлено тем, что была использована именно кольцевая молекула ДНК, в ряде работ показана большая эффективность использования линейаризованного плазмидного вектора, который ограничен лишь плечами гомологии и селекционной кассетой и не содержит остальных элементов донорной плазмиды [17]. Однако использование одноцепочечного олигонуклеотида в качестве донорной молекулы показало эффективное внесение целевой замены Т>С в 7-й экзон гена *SMN2* в ИПСК и ПМН. Это согласуется с данными о том, что для внесения однонуклеотидных замен предпочтительнее использование коротких олигонуклеотидов в качестве донорной молекулы для рекомбинации [8].

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-10041).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Немудрому А.А. за помощь в сборке плазмиды pX552_miCMV_Puro_SMN.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Leary, R., McMacken, G., Konig, K., Kirschner, J., Jones, C.C., Cook, S.F., and Lochmuller, H. (2017) A multi-source approach to determine SMA incidence and research ready population, *J. Neurol.*, **264**, 1465–1473, doi: 10.1007/s00415-017-8549-1.
2. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frezal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., and Melki, J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene, *Cell*, **80**, 155–165, doi: 10.1016/0092-8674(95)90460-3.
3. Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., and McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing

- patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1177–1183.
4. Cartegni, L., and Krainer, A.R. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1, *Nat. Genet.*, **30**, 377–384, doi: 10.1038/ng854.
 5. Kashima, T., and Manley, J.L. (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy, *Nat. Genet.*, **34**, 460–463, doi: 10.1038/ng1207.
 6. McAndrew, P.E., Parsons, D.W., Simard, L.R., Rochette, C., Ray, P.N., Mendell, J.R., Prior, T.W., and Burghes, A.H. (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN1 and SMN2 gene copy number, *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 1411–1422, doi: 10.1086/515465.
 7. Gidaro, T., and Servais, L. (2019) Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps, *Dev. Med. Child Neurol.*, **61**, 19–24, doi: 10.1111/dmcn.14027.
 8. Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N., and Chesnut, J.D. (2017) Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA, *J. Biotechnol.*, **241**, 136–146, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.011.
 9. Valetdinova, K.R., Maretina, M.A., Kuranova, M.L., Grigor'eva, E.V., Minina, Y.M., Kizilova, E.A., Kiselev, A.V., Medvedev, S.P., Baranov, V.S., and Zakian, S.M. (2019) Generation of two spinal muscular atrophy (SMA) type I patient-derived induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and two SMA type II patient-derived iPSC lines, *Stem Cell Res.*, **34**, 101376, doi: 10.1016/j.scr.2018.101376.
 10. Du, Z.W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C. L., Zhong, X., Fan, F., and Zhang, S.C. (2015) Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells, *Nat. Commun.*, **6**, 6626, doi: 10.1038/ncomms7626.
 11. Clarke, R., Heler, R., MacDougall, M.S., Yeo, N.C., Chavez, A., Regan, M., Hanakahi, L., Church, G.M., Marraffini, L.A., and Merrill, B. (2018) Enhanced bacterial immunity and mammalian genome editing via RNA-polymerase-mediated dislodging of Cas9 from double strand DNA breaks, *Mol. Cell*, **71**, 42–55, doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.005.
 12. Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e168, doi: 10.1093/nar/gku936.
 13. Ishida, K., Gee, P., and Hotta, A. (2015) Minimizing off-target mutagenesis risks caused by programmable nucleases, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24751–24771, doi: 10.3390/ijms161024751.
 14. Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A., and Zhang, F. (2015) In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9, *Nature*, **520**, 186–191, doi: 10.1038/nature14299.
 15. Lin, Y., Cradick, T.J., Brown, M.T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B.M., Vertino, P.M., Stewart, F.J., and Bao, G. (2014) CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7473–7485, doi: 10.1093/nar/gku402.
 16. Nemudryi, A.A., Valetdinova, K.R., Medvedev, S.P., and Zakian, S.M. (2014) TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery, *Acta Naturae*, **6**, 19–40.
 17. Song, F., and Stieger, K. (2017) Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **7**, 53–60, doi: 10.1016/j.omtn.2017.02.006.

METHODS FOR CORRECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE SUBSTITUTION c.840C>T IN THE EXON 7 OF THE SMN2 GENE

K. R. Valetdinova^{1,2,3,4*}, V. S. Ovechkina^{1,2,3,4}, and S. M. Zakian^{1,2,3,4}

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: valetdinova@bionet.nsc.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

³ Meshalkin National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Received April 30, 2019

Revised June 3, 2019

Accepted June 3, 2019

CRISPR/Cas technology possesses great potential capabilities for the treatment of many hereditary diseases. Among this type of diseases, a potential candidate is spinal muscular atrophy (SMA) caused by the deletion of the *SMN1* gene encoding the SMN protein necessary for the survival of motor neurons. Patients' genome contains from one to several copies of the *SMN2*, a gene paralogous to *SMN1*, exon 7 of which has a single nucleotide substitution c.840C>T, leading to a splicing defect and a decrease in the synthesis of full-length SMN protein. The object of this study was to create and test different gene editing systems for the correction of single nucleotide substitution c.840C>T in exon 7 of the *SMN2* gene in fibroblasts, induced pluripotent stem cells (iPSC), and motor neurons progenitors (MNP) obtained from a SMA patient. In the experiments we used plasmid vectors to express CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1 components, as well as the plasmid donor and 90-nt single-stranded oligonucleotide templates. Delivery of donors and plasmids into cells was carried out by electroporation. It has been shown that sgRNA_T2 and sgRNA_T3 protospacers were more efficient than sgRNA_T1 in fibroblasts from the SMA type I patient ($p < 0.05$). No significant differences in the editing efficiency of exon 7 of *SMN2* were found with sgRNA_T1, sgRNA_T2, and sgRNA_T3 in patient-specific iPSC and MNP. The plasmid vector expressing sgRNA_T1 and the 90-nt single-stranded oligonucleotide donors demonstrated the highest editing efficiency of substitution c.840C>T in exon 7 of the *SMN2* gene in iPSC and MNP.

Keywords: spinal muscular atrophy, induced pluripotent stem cells, motor neuron progenitors, gene editing