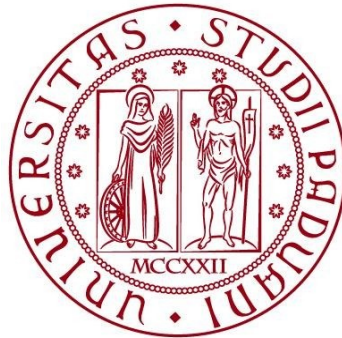


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Mantenimento a lungo termine dell'espressione della distrofina e della  
resistenza ai danni del muscolo scheletrico in topi DMD modificati  
mediante editing del gene**

**Tutor:** Prof./Dott. Paolo Laveder  
Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Giulia Valente

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## ABSTRACT

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia caratterizzata da una progressiva degenerazione dei muscoli scheletrici e cardiaci, che porta alla perdita della deambulazione e a morte prematura. La DMD è una malattia ereditaria associata a una mutazione sul cromosoma X del gene codificante la proteina distrofina, fondamentale per la funzionalità e l'integrità muscolare. Negli anni l'utilizzo dell'editing genomico tramite CRISPR/CAS9 ha dimostrato ampio successo nel correggere le mutazioni provocanti DMD negli animali modello di giovane età. La longevità e la persistenza a lungo termine dell'editing con CRISPR/CAS9 erano ancora però sconosciute. In questo studio, si è effettuato un delivery sistemico delle componenti CRISPR-Cas9 tramite AAV9 nel modello murino DMD  $\Delta$ Ex44, portando all'espressione della distrofina, al mantenimento strutturale e funzionale del muscolo e al ripristino del *signaling* cellulare. La correzione genomica che ripristina lo schema di lettura dell'esone 45 del gene *Dmd* è duratura nel tempo e mantiene i livelli di espressione di proteina distrofina portando a un recupero funzionale di resistenza delle fibre muscolari. Lo studio dimostra quindi il mantenimento e il successo a lungo termine dell'editing genomico tramite CRISPR-Cas9 per curare la DMD in un modello murino.

## SOMMARIO

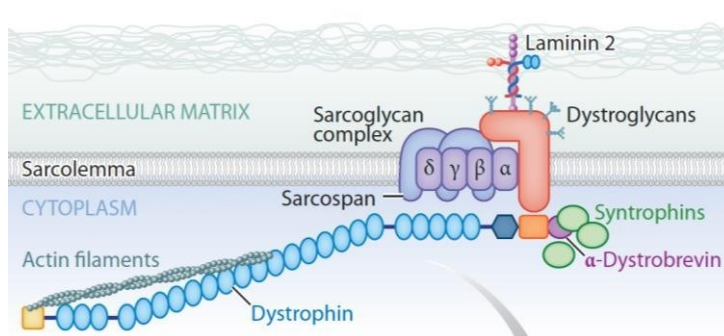
<b>1. STATO DELL'ARTE</b> .....	<b>3</b>
1.1 Distrofia muscolare di Duchenne .....	3
1.2 Editing del gene DMD mediante CRISPR/Cas9 .....	4
1.3 Cellule satelliti del muscolo scheletrico.....	5
1.4 Quanto dura la correzione del gene DMD?.....	6
<b>2. APPROCCIO SPERIMENTALE</b> .....	<b>6</b>
2.1 Scopo dello studio .....	6
2.2 Produzione AVV9 .....	6
2.3 Delivery in vivo nei topi $\Delta$ Ex44 di AVV9 esprimente CRISPR .....	7
2.4 Corsa in discesa .....	7
2.5 Analisi istologiche dei muscoli scheletrici.....	8
2.6 Western blot per la distrofina e SpCas9 .....	8
2.7 Fisiologia muscolare.....	8
2.8 Misurazione della creatina chinasi sierica.....	8
2.9 Misurazione della forza di attacco .....	9
2.10 Induzione di ingiurie tramite BaCl <sub>2</sub> .....	9
2.11 Quantificazione del genoma virale nei muscoli scheletrici .....	9
2.12 Sequenziamento RNA .....	9
2.13 Analisi TIDE .....	9
2.14 Analisi di deep-sequencing dell'amplicone di DNA genomico .....	10
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>10</b>
3.1 L'editing genetico a singolo taglio effettuato da CRISPR/Cas9 nei topi DEx44 previene il danno muscolare scheletrico indotto dalla corsa .....	10
3.2 Il gene editing con CRISPR/Cas9 normalizza il trascrittoma dei muscoli scheletrici corretti $\Delta$ Ex44.....	13
3.3 La distruzione delle miofibre risulta nella perdita di espressione della distrofina geneticamente editata .....	16
3.4 L'espressione della distrofina geneticamente editata è sostenuta in topi DEx44 corretti dell'età di 18 mesi.....	17
3.5 Analisi dell'espressione di SpCas9 e gene editing in topi di 18 mesi d'età.....	17
3.6 L'omeostasi trascrizionale viene mantenuta nel muscolo scheletrico $\Delta$ Ex44-corretto di 18 mesi.....	18
3.7 Discussione .....	19
<b>4. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>21</b>

## 1. STATO DELL'ARTE

### 1.1 Distrofia muscolare di Duchenne

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è la più comune patologia tra le distrofie muscolari, le quali si manifestano con un progressivo indebolimento e degenerazione muscolare dei muscoli scheletrici e secondariamente cardiaci. La DMD è causata dall'assenza o dal non funzionamento della proteina distrofina a causa di mutazioni genetiche. Il gene della distrofina è localizzato nel braccio sinistro del cromosoma X: questo determina l'ereditarietà genetica della malattia e la maggior frequenza negli individui di sesso maschile in quanto emizigoti. L'incidenza è infatti di 1 su 3600 maschi nati vivi i quali perdono la capacità di deambulare all'età di 12 anni; l'aspettativa massima di vita si aggira verso i 20 anni. Il gene codificante la distrofina è il più lungo gene umano, si espande infatti per una regione di 2400 Kb ed è composto da 79 esoni. Data la grande lunghezza sono state descritte negli anni numerose mutazioni (delezioni, inserzioni, mutazioni puntiformi) che portano all'assenza della proteina o a un suo malfunzionamento. La distrofina non è coinvolta direttamente nella contrazione muscolare, piuttosto è una proteina sarcoplasmatica del complesso di membrana distrofina-glicoproteina (DGC) il quale è responsabile della trasduzione della forza attraverso il sarcolemma e del mantenimento dell'integrità della membrana. La distrofina gioca quindi un ruolo importante nella protezione delle fibre muscolari dai danni e infortuni e nel loro rafforzamento. (Figura 1.1). In particolare, l'estremità N-terminale interagisce coi filamenti di actina attenuando così i danni muscolari indotti dalla contrazione. In assenza della distrofina le fibre muscolari degenerano e sono rimpiazzate da tessuto connettivo.

**Figura 1.1:** *il DGC risiede nel sarcolemma delle miofibre. La parte N terminale della distrofina interagisce coi filamenti di actina mentre quella C-terminale insieme al DGC contribuisce alla stabilità della membrana*



Una malattia simile alla DMD ma con fenotipo più lieve, è la distrofia muscolare di Becker, in cui viene mantenuta una parziale funzionalità del gene della distrofina che porta alla perdita di deambulazione in età più avanzata, 27 anni, e un'aspettativa di vita di 40. Di particolare rilievo si è visto essere la regione compresa fra l'esone 43 e il 55 in cui le mutazioni sono maggiormente deleterie per la proteina. Questa parte della proteina codifica un dominio dato da ripetizioni di spectrina.

Quando la mutazione interrompe lo schema di lettura manca la parte C-terminale della distrofina con perdita della funzione e si ha la forma grave, DMD. Se invece le mutazioni sono meno deleterie potremmo avere dei troncamenti o degli esoni in meno ma la proteina rimarrà parzialmente funzionale manifestando così il fenotipo più lieve BMD. La differenza tra le due forme risiede nella differenza di mutazioni

presenti; infatti, nella DMD le mutazioni più comuni sono la delezione dell'esone 50 o la delezione dell'esone 44.

Ci sono diversi modelli sperimentali per studiare la DMD, tra cui quello più usato è il topo. Il modello naturale della DMD è il topo mdx in cui è presente una mutazione spontanea puntiforme nell'esone 23 che causa un'interruzione della sintesi della proteina distrofina, in quanto viene a mancare l'intero dominio C-terminale. Prima della tecnologia CRISPR-Cas9 questo era il modello d'elezione per studiare la DMD. Il problema di tale modello mdx era il fenotipo meno grave rispetto alla malattia umana. Recentemente, utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9 per eliminare l'esone 44, si è creata una linea di topi che ricapitolano maggiormente il fenotipo Duchenne umano: i topi  $\Delta Ex44$ .

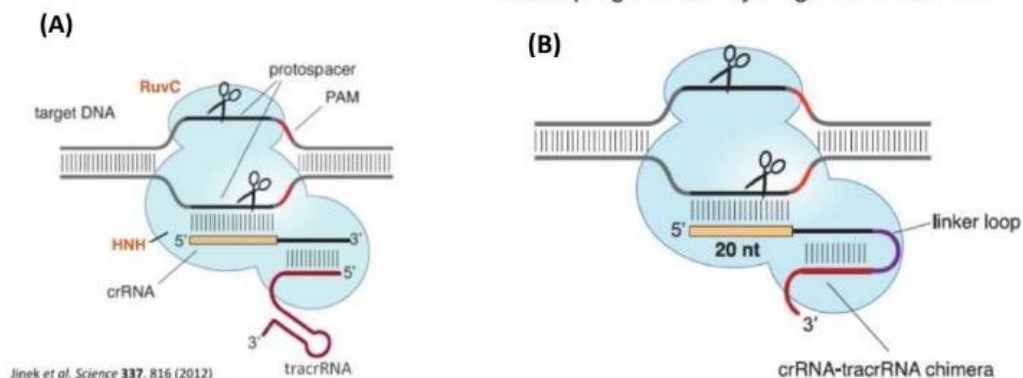
## 1.2 Editing del gene DMD mediante CRISPR/Cas9

Il gene editing tramite la tecnologia CRISPR/Cas9 permette la correzione del difetto che causa DMD nei topi. I tessuti muscolari sono longevi, l'utilizzo di tale approccio potrebbe offrire un trattamento duraturo per le distrofie muscolari, portando alla correzione delle mutazioni genomiche e ripristinando così la normale espressione del gene *Dmd*. Il sistema CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) è un sistema endogeno dei batteri e funziona come una sorta di sistema immunitario contro le infezioni virali in quanto degrada il genoma di tali invasori prima che uccidano il batterio. Il funzionamento di tale sistema prevede la trascrizione del crRNA che forma un ibrido con il tracrRNA (*trans-activating crRNA*). Questa struttura, detta gRNA (RNA guida) richiama il complesso proteico Cas, formando così l'enzima attivo che va a riconoscere e tagliare il genoma virale tramite la nucleasi che contiene due diversi domini proteolitici per tagliare le due eliche di DNA:

- HNH (*homing endonuclease*) taglia il filamento complementare al gRNA
- RuvC (*resolvase-like*) taglia il filamento non complementare.

L'ingegnerizzazione di tale sistema ha permesso di applicare l'editing genomico nelle cellule eucarioti. La strategia prevede che le due molecole crRNA e tracrRNA, che agivano separatamente nei batteri, siano legate assieme per l'aggiunta di un *linker loop*. Questa chimera clonata in un vettore plasmidico di trascrizione viene trascritta in maniera altamente efficiente. L'RNA prodotto è inserito in un vettore adenovirale difettivo per la replicazione e viene trasfettato contemporaneamente a un secondo vettore adenovirale difettivo codificante la nucleasi Cas9 all'interno della cellula bersaglio. Avremo così la formazione del complesso attivo *in vivo* che andrà a tagliare il DNA nel punto desiderato della cellula bersaglio (Figura 1.2). La specificità d'azione è legata al fatto che possiamo progettare in laboratorio la sequenza del RNA-guida, dirigendo così il taglio nelle sequenze di interesse. La rottura a doppio filamento (DSB) innesca il processo di riparazione del DNA. La riparazione tramite NHEJ comporta un editing del genoma dato dall'incorporazione di brevi inserimenti e/o delezioni denominati INDEL.

Cas9 is a dual-RNA-guided dsDNA endonuclease Cas9 programmed by single chimeric RNA



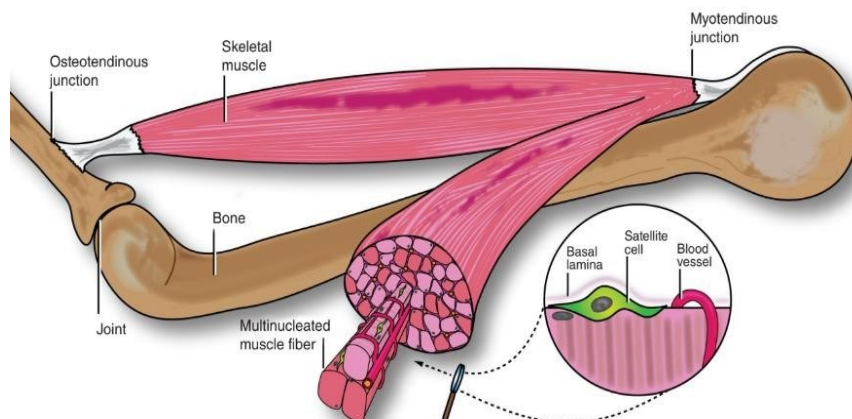
**Figura 1.2:** (A) e (B) da: Jinek M et al., Science 337:816-21, 2012.

Nel nostro studio tramite il gene editing lasciamo che i meccanismi endogeni di riparo del DNA intervengano e vadano a ripristinare l’espressione del gene Dmd. La cura non risulterà in un gene Dmd identico al gene originale completo, il quale potrà aver perso una parte di esso risultando in una proteina più corta ma funzionale.

In sintesi, il riparo tramite CRISPR-Cas9 con tecnologia a “single-cut” prevede un singolo taglio guidato, al quale segue l’attivazione del sistema di riparo del danno al DNA NHEJ-mediato che permette, con una certa frequenza, di avere un recupero della funzionalità d’espressione della distrofina. Nei topi ΔEx44 questa strategia induce un singolo DSB nell’esone 45 del gene DMD, e le inserzioni o le delezioni generate dalla riparazione NHEJ ripristinano il frame di lettura dell’esone 45 stesso.

### 1.3 Cellule satelliti del muscolo scheletrico

Le cellule staminali sono le cellule staminali del muscolo scheletrico. Quest’ultimo è organizzato in fasci composti da numerose miofibre, ovvero un insieme di cellule cilindriche multinucleate circondate da una vasta rete di vasi sanguigni e nervi. Le cellule satelliti sono piccole cellule mononucleate situate tra il plasmalemma delle miofibre e la membrana basale.



**Figura 1.3,** da Dumont NA et al, Compr Physiol. 2015 Jul 1;5(3):1027-59.

Le cellule staminali sono solitamente in forma di riposo, ovvero quiescente e rientrano rapidamente nel ciclo cellulare a seguito di stimoli, quali lesioni o fattori di crescita. Pertanto, queste cellule sono i mediatori della rigenerazione muscolare

dei muscoli scheletrici in quanto permettono di ripristinare completamente le miofibre solo poche settimane dopo una grave lesione che ne ha distrutto l'integrità.

Il meccanismo con cui avviene tale rigenerazione è tramite la migrazione delle cellule satelliti attivate, le quali proliferano, si differenziano, e infine si fondono assieme per formare le nuove miofibre. Un sottinsieme di cellule staminali attive è in grado di resistere alla differenziazione durante la lesione muscolare e tornare alla quiescenza dopo il completamento della rigenerazione muscolare. Questo serve a ricostituire il pool di cellule satelliti che possono rigenerare il tessuto alla successiva lesione. Il destino delle cellule satelliti, verso la differenziazione o viceversa, è fortemente influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci come: interazioni dinamiche con cellule infiammatorie, cellule stromali, segnali trofici e componenti della matrice extracellulare. Anche molte condizioni patologiche, ad esempio le distrofie muscolari o l'atrofia muscolare, forniscono segnali inadeguati alle cellule satelliti compromettendo il loro potenziale rigenerativo.

Nella somministrazione del sistema di gene editing CRISPR/Cas9 vengono utilizzati dei vettori virali che hanno un tropismo alto per le cellule del muscolo scheletrico. Le cellule satelliti essendo cellule staminali e quindi indifferenziate hanno delle caratteristiche diverse da quelle del muscolo scheletrico pur facendo parte di esso; pertanto, bisognerà andare a valutare se il gene editing nei muscoli scheletrici distrofici porti la correzione anche a tale livello.

#### 1.4 Quanto dura la correzione del gene DMD?

Nei topi mdx si era dimostrato che la correzione genica veniva mantenuta nel tempo, per un periodo di almeno 18 mesi. In tale studio approfondiremo invece quanto sia duraturo il gene editing tramite CRISPR-Cas9 nel modello  $\Delta$ Ex44, più vicino alla forma grave umana, in quanto non ancora approfondito in letteratura.

## 2. APPROCCIO SPERIMENTALE

### 2.1 Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è valutare in modelli murini distrofici la longevità e la durata della correzione genetica apportata al gene *Dmd* mediante gene-editing con CRISPR/Cas9. Il modello  $\Delta$ Ex44 utilizzato porta una mutazione non naturale ma che è più simile a quella che causa la distrofia muscolare di Duchenne nell'uomo. I topi utilizzati nello studio e il lavoro su di essi svolto è stato approvato e condotto sotto la supervisione della UT Southwestern Institutional Animal Care and Use Committee.

### 2.2 Produzione AAV9

I vettori AAV di sierotipo 9 (AAV9) sono prodotti dal Boston Children's Hospital Viral Core, sono stati purificati tramite gradiente discontinuo di iodixanolo (Cosmo Bio) e poi concentrati tramite filtri Millipore Amicon (100 kDa).

I titoli di AAV sono determinati tramite saggio di PCR quantitativa (qPCR): 4  $\mu$ l del vettore AAV è trattato con DNasi I e 2 M NaOH, seguiti da neutralizzazione. Si eseguono poi le diluizioni seriali della miscela e una qPCR con gli appositi

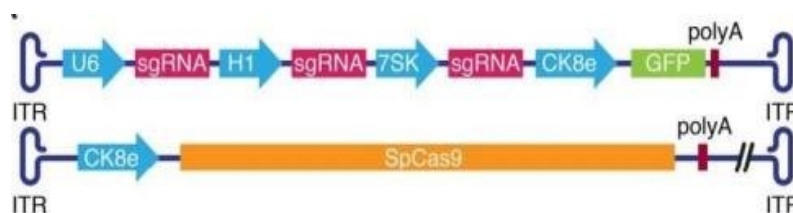


primer. Il numero di copie è stato determinato da una curva standard fatta da diluizioni seriali del plasmide transgene.

### 2.3 Delivery *in vivo* nei topi ΔEx44 di AAV9 esprimente CRISPR

I topi DMD ΔEx44 sono anestetizzati prima delle iniezioni di AAV9. L'iniezione è intraperitoneale, avviene al quarto giorno postnatale (P4) nei cuccioli maschi di topo ΔEx44 DMD tramite un ago ultrafine (31 gauge) e prevede 80 μl di miscela virale contenente i due vettori AAV9-SpCas9 e AAV9-single-guide RNA. Per gli studi a lungo termine il delivery virale prevedeva un dosaggio di  $5 \times 10^{13}$  vg/kg di AAV-Cas9 e  $2,5 \times 10^{14}$  vg/kg di ssAAV-sgRNA. Mentre gli studi sulla longevità erano in corso, il gruppo di ricerca ha scoperto che il confezionamento della cassetta di espressione di sgRNA in scAAV (*self-complementary* AAV) aumentava l'espressione della sgRNA e migliorava l'efficienza di editing genetico. Pertanto, per gli studi sulle ingiurie e le analisi trascrittomiche nei topi più giovani, i virus sono stati somministrati con dosi di  $8 \times 10^{13}$  vg/kg per ssAAV-SpCas9 e  $8 \times 10^{13}$  vg/kg per scAAV-sgRNA.

AAV9 è un vettore composto da un adenovirus a DNA a filamento singolo che mostra tropismo elevato sia al muscolo scheletrico che al cuore ed era già stato utilizzato in numerosi studi clinici. Oltre al tropismo elevato di AAV9 per il muscolo scheletrico, per ottenere una specificità maggiore nell'editing genetico, è stata utilizzata la cassetta regolatoria della creatina chinasi 8 (CK8e). CK8e combina elementi chiave delle regioni *enhancer* e del promotore del gene CK muscolare permettendo così di guidare l'espressione di SpCas9 miratamente nel muscolo scheletrico e nel cuore. Per l'espressione di sgRNA invece si sono utilizzati tre promotori della RNA polimerasi III (U6, H1 e 7SK), in modo da esprimere tre copie dello sgRNA. Per verificare che questi venissero espressi nel muscolo scheletrico a valle di questa regione si è inserito un gene reporter, codificante GFP, sotto il controllo di CK8e in quanto muscolo specifico. (Figura 2).



**Figura 2:** Illustrazione del costrutto AAV per il delivery di CRISPR/Cas9. La cassetta regolatoria della creatina chinasi 8 muscolare (CK8e) è stata usata per esprimere SpCas9 e la GFP. I promotori della polimerasi III, U6, H1, e 7SK sono stati usati per esprimere sgRNAs. Le ITR sono le ripetizioni invertite terminali.

### 2.4 Corsa in discesa

La corsa in discesa è un test che prevede di sottoporre i modelli murini di 4 settimane d'età a dei cicli di corsa in discesa su un tapis roulant a giorni alterni per un mese in cui ogni sessione di corsa ha una durata di 30 minuti ed è svolta a una velocità di 12m/min a un'inclinazione di 25°. È noto che la corsa forzata porta a severe ingiurie muscolari nel tempo ai topi mdx. Pertanto, svolto questo test in topi

WT, ΔEx44 e ΔEx44-corretti si riesce a determinare tramite confronto dalle analisi istologiche precedenti e successive al protocollo di corsa se il gene-editing tramite CRISPR/Cas9 rende i muscoli resistenti dal danneggiamento cronico muscolare.

### 2.5 Analisi istologiche dei muscoli scheletrici

I campioni utilizzati nelle analisi istologiche sono i muscoli scheletrici prelevati da topi WT, ΔEx44 e ΔEx44-corretti. Dopo la dissezione si deposita il campione in una soluzione 1:2 di polvere Gum Tragacanth e mezzo di congelamento e si congela in isopentano a T= -155°C. Si conservano -80°C prima di sezionarli tramite l'utilizzo del criostato Leica CM3050, ottenendo sezioni trasversali di 8µm di muscolo scheletrico su cui viene condotta l'immunoistochimica (IHC) o H&E. La distrofina nel campione viene rilevata tramite l'utilizzo di anticorpi murini anti-distrofina (1:1000, MANDYS8, Sigma-Aldrich, D8168) e dell'immunoglobulina anti-mouse biotinilata (BMK-2202, Vector Laboratories). L'analisi istologica dei muscoli scheletrici permette di valutare se le fibre muscolari presentino i tipici tratti della DMD, ovvero fibre muscolari ipercontratte, di dimensioni varie, con una forma piccola tonda o poligonale, nuclei centralizzati, la presenza di aree di necrosi e un aumento del tessuto adiposo e connettivo tra le fibre muscolari.

### 2.6 Western blot per la distrofina e SpCas9

I muscoli scheletrici sono lisati in 10% di SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.8), 1 mM EDTA, e inibitore di proteasi. Le proteine recuperate sono state caricate in 4%–20% Criterion TGX Stain-Free Protein Gel. Sono stati condotti l'elettroforesi SDS-PAGE, il trasferimento di membrana e il blotting di membrana. Gli anticorpi usati nell'analisi di Western blot sono anticorpi anti-distrofina murina (1:1000, MANDYS8, Sigma-Aldrich, D8168), anticorpi anti-SpCas9 murina (1:1000, clone 7A9, Millipore, MAC133), e anticorpi anti-vinculina murina (1:1000, Sigma-Aldrich, V9131). Gli anticorpi secondari utilizzati sono anticorpi di capra anti-topo perossidasi di rafano (HRP) (1:10,000, BioRad).

### 2.7 Fisiologia muscolare

I muscoli EDL e soleo sono stati chirurgicamente isolati da topi WT, ΔEx44 e ΔEx44-corretti dopo 4 settimane di corsa in discesa forzata. Gli isolati sono stati montati su trasduttori di forza «Grass FT03.C» in un bagnetto di soluzione fisiologica salina a 37°C continuamente esposta a gas (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). I dati sono registrati per mezzo dell'unità di acquisizione dati Powerlab 8/SP. A seguito della calibrazione, i muscoli sono stati aggiustati a una lunghezza iniziale tale per cui la forza passiva era di 0.5 g. La stimolazione muscolare è stata effettuata tramite due elettrodi a filo di platino per stabilire la lunghezza ottimale che produce la massima tensione tetanica isometrica seguendo il protocollo step by step (impulsi a 150 Hz per 2 s). La forza specifica (nN/mm<sup>2</sup>) è stata calcolata per normalizzare le risposte di contrazione all'area trasversale dei tessuti.

### 2.8 Misurazione della creatina chinasi sierica

La misurazione della creatina chinasi (CK) sierica permette di valutare l'eventuale presenza di danno muscolare perché quando questo si verifica, la quantità di CK rilasciata nel sangue è molto aumentata. Il sangue viene raccolto tramite prelievo

dalla vena sub-mandibolare e centrifugato alla temperatura di 4°C per 15.000 giri/g in modo da separare il siero. L'attività della CK è stata misurata utilizzando i vetrini VITROS Chemistry 7.

### 2.9 Misurazione della forza di attacco

Gli studi sulla misurazione della forza di attacco degli arti superiori dei topi WT, ΔEx44, e ΔEx44-corretti sono stati svolti tutti in cieco. La forza muscolare è stata misurata tramite gli Strumenti di Columbus. I topi di 4 settimane sono stati rimossi dalla gabbia e pesati. Sollevando per la coda i topi questi si attaccavano tramite gli arti anteriori ai tiranti collegati al misuratore della forza di presa. Il topo è stato poi trascinato in linea retta rispetto al sensore e si è misurata la forza massima di presa che è equivalente a quella esercitata nel momento in cui il topo si stacca dalla griglia poiché la forza esercitata contro di lui è troppo elevata. Il test viene ripetuto dalle 5 alle 6 volte. Dopo la corsa in discesa questo test ha mostrato una diminuzione del 40% della forza di presa nei topi ΔEx44 relativamente ai WT, mentre al contrario la forza di presa dei ΔEx44-corretti era indistinguibile da quella dei WT.

### 2.10 Induzione di ingiurie tramite BaCl<sub>2</sub>

L'iniezione di BaCl<sub>2</sub> provoca una veloce ablazione delle fibre muscolari, le quali si rigenerano tramite la successiva attivazione delle cellule satelliti del muscolo scheletrico. Lo scopo è il verificare se le nuove fibre generate mantenevano l'espressione della proteina distrofina geneticamente modificata. L'iniezione di BaCl<sub>2</sub> è eseguita su topi preventivamente anestetizzati con Avertin al 5%, e avviene nel muscolo tibiale anteriore (TA) destro tramite una soluzione di 50μL con 1,2%(w/v) di BaCl<sub>2</sub> in soluzione salina. Nel muscolo tibiale anteriore sinistro del medesimo topo sono iniettati 50 μL di soluzione salina, è usata come controllo negativo non portando a ingiurie muscolari. A due mesi dall'iniezione entrambi i muscoli TA vengono esportati e analizzati per il genome editing, la presenza di distrofina, e l'istologia.

### 2.11 Quantificazione del genoma virale nei muscoli scheletrici

Il numero di copie virali presenti nei muscoli scheletrici è stato quantificato con una PCR quantitativa (qPCR) utilizzando dei primer specifici che appaiano sul gene SpCas9.

### 2.12 Sequenziamento RNA

I muscoli dei quadricipiti criopreservati sono stati omogenizzati in TRIzol (Thermo Fisher Scientific). L'RNA è stato isolato usando colonne QIAGEN RNeasy. La preparazione della libreria di mRNA è stata condotta usando KAPA mRNA HyperPrep Kit (Roche). Sono state svolte poi analisi e sequenziamento profondo.

### 2.13 Analisi TIDE

Analisi per rilevare gli INDEL. È stata condotta una PCR per amplificare una regione di 500 bp attorno al sito target dove abbiamo condotto il taglio di Cas9: esone 45 del gene della distrofina (Dmd). I due primer di PCR disegnati, forward e reverse, sono specifici per tale regione. Dopo la PCR si è condotto un sequenziamento Sanger per ogni clone. Gli INDELs sono stati analizzati utilizzando un software: TIDE package (<https://www.tide.deskgen.com>). Se la sequenza è

uguale all'originale non avremmo INDELS, se invece si discosta per delezione di uno o due nucleotidi segneremo una conta.

#### 2.14 Analisi di deep-sequencing dell'amplicone di DNA genomico

Il DNA genomico è stato isolato dai muscoli scheletrici utilizzando un DNeasy and Blood & Tissue Kit (QIAGEN). La PCR condotta ha amplificato le regioni genomiche contenenti i siti target di CRISPR/Cas9 e i previsti siti off-target. I siti off-target sono quelli con maggior somiglianza di sequenza con il sito bersaglio. Il secondo ciclo di PCR è stato svolto aggiungendo le sequenze di legame e dei barcodes nelle celle di flusso di Illumina. Per il sequenziatore Illumina sono usati dei primer appositi per le regioni di interesse. A seguire è stato svolto l'esame informatico delle sequenze ottenute.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 L'editing genetico a singolo taglio effettuato da CRISPR/Cas9 nei topi DEx44 previene il danno muscolare scheletrico indotto dalla corsa

Un test usato per valutare la resistenza dei modelli murini a lesioni croniche a livello muscolare è la corsa in discesa su un tapis roulant; studi precedenti avevano dimostrato che a termine del protocollo di corsa in discesa i topi mdx sviluppano gravi lesioni muscolari.

Partendo dai topi modello maggiormente somiglianti alla DMD umana:  $\Delta$ Ex44; si è effettuata la correzione genetica di questi grazie alla somministrazione intraperitoneale di due vettori adenovirali, AAV9-SpCas9 e AAV9-single-guide RNA. Per avere un controllo sito-specifico dell'espressione dei vettori, in modo da garantire come target il muscolo scheletrico, l'espressione di SpCas9 è stata posta sotto il controllo del promotore CK8e in quanto elemento regolatore di un gene muscolo-specifico mentre l'espressione di sgRNA, essendo una guida ad RNA e non un RNA messaggero codificante proteine è stata posta sotto il controllo di tre diversi promotori della RNA polimerasi III che nelle cellule murine si occupa dell'espressione di RNA non codificanti.

L'iniezione di queste componenti ha permesso il ripristino del frame di lettura dell'esone 45 con la riacquisizione dell'espressione della proteina distrofina funzionale anche se leggermente più corta in quanto mancante di 48 amminoacidi del dominio nNOS. Il recupero della proteina avviene tramite la produzione di un unico taglio generante un singolo DSB a livello dell'esone 45 del gene Dmd, il quale attiva il riparo tramite non-homologous end-joining (NHEJ) che risulta in delezioni o inserzioni che ripristinano il frame corretto di lettura della distrofina.

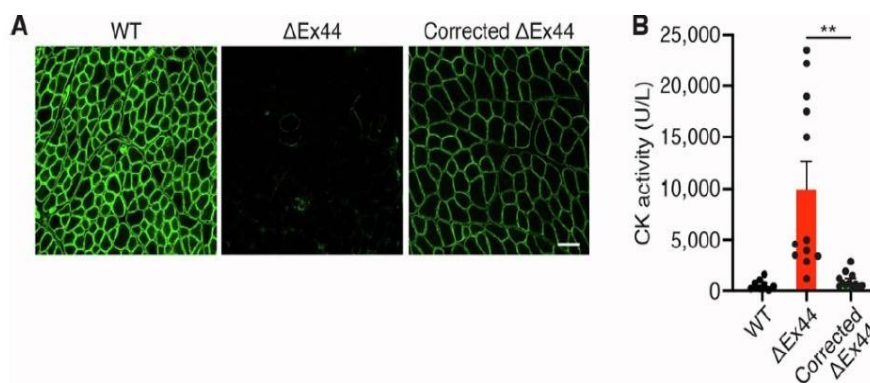
Per verificare se la correzione tramite editing genetico nei topi  $\Delta$ Ex44 sia avvenuta correttamente si effettua un'IHC osservando i livelli di espressione di distrofina nel muscolo tibiale anteriore (TA) di topi WT,  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti; a seguire tramite prelievo di sangue da topi WT,  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti si è rilevata l'attività della CK sierica, l'elevata presenza di questa è indice di danno muscolare (Figura 3A).

L'IHC svolta nel muscolo TA di topi a 1 mese d'età mostra come la corretta espressione di distrofina sia: presente nel muscolo WT, assente nei  $\Delta$ Ex44 e presente in più del 90% delle fibre muscolari  $\Delta$ Ex44-corrette. I topi  $\Delta$ Ex44-corretti mostrano inoltre una riduzione del 90% dell'attività della CK sierica (Figura 3B).

**Figura 3: (A)**

*l'IHC mostra il ripristino della distrofina nel muscolo TA dei topi distrofici.*

**(B)** *Attività della creatina chinasi sierica (CK) in topi di 4 settimane d'età WT,  $\Delta$ Ex44,  $\Delta$ Ex44 corretti.*



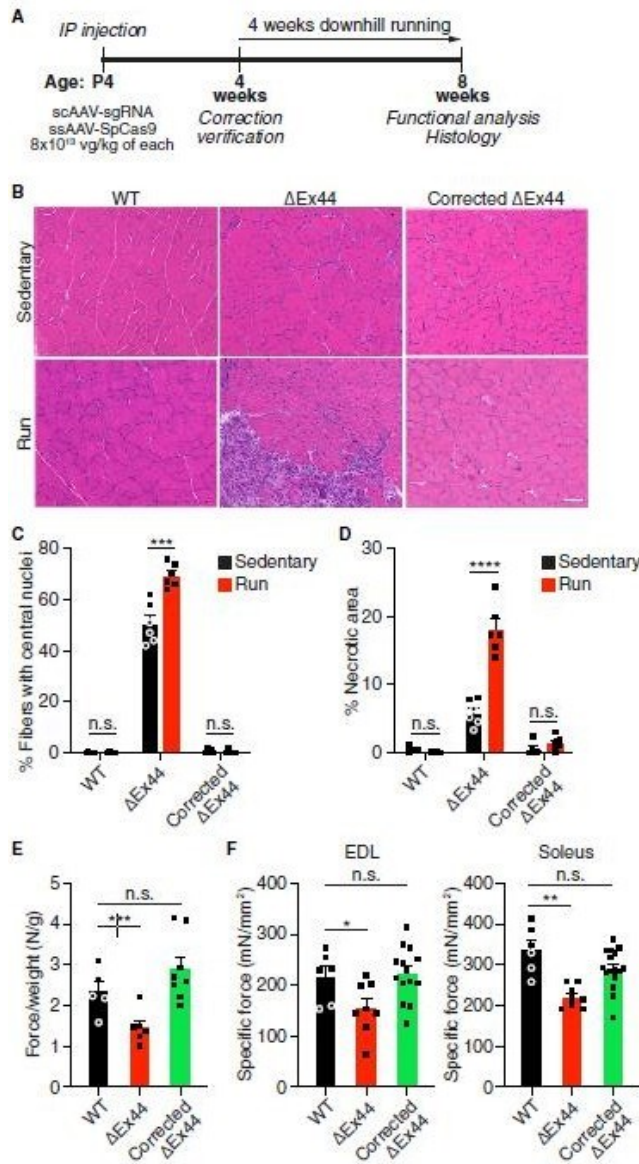
Grazie all'IHC e il dosaggio della CK sierica possiamo convalidare l'avvenuto recupero di espressione della proteina distrofina a seguito della correzione apportata tramite gene editing con CRISPR-Cas9 in topi  $\Delta$ Ex44-corretti.

Si procede poi con il protocollo di corsa in discesa, della durata di 4 settimane, seguendo le linee guida TREAT-Neuromuscular Disease (Figura 4A). Lo scopo è valutare la comparsa di lesioni croniche muscolari provocate da tale test in topi wild-type (WT),  $\Delta$ Ex44 e topi  $\Delta$ Ex44-corretti. A seguito del protocollo di corsa forzata in discesa si osserva la presenza nel quadricipite di nuclei centralizzati e aree di necrosi nei muscoli scheletrici tramite colorazione H&E. Successivamente a tale analisi si è svolto un dosaggio della CK sierica.

La presenza di nuclei centralizzati nelle cellule muscolari e di aree necrotiche è un marker di rigenerazione del muscolo scheletrico molto importante. Confrontando i muscoli tra topi sedentari e dopo il protocollo di corsa forzata in discesa, tramite H&E (Figure 4B) e quantificando i nuclei centralizzati e l'area necrotica (Figure 4C, 4D) si evince come i WT non presentino comparsa di nuclei centralizzati e aree di necrosi mentre, al contrario, dei topi  $\Delta$ Ex44 mostrino prominenti nuclei centralizzati e aree di necrosi nei muscoli quadricipite, TA, e diaframma a seguito della corsa in discesa. I muscoli scheletrici dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti sono invece stati protetti grazie all'editing genetico dai danni causati dalla corsa in discesa mostrando un aumento non significativo sia dei nuclei centralizzati che dell'area di necrosi dopo la corsa in discesa rispetto alla situazione sedentaria. Si è osservato meno del 5% di nuclei centralizzati e meno dell'1% di area di necrosi. (Figure 4B, 4C, 4D). Per valutare l'integrità delle fibre muscolari è stato quindi eseguito il dosaggio dell'attività della CK sierica dimostratasi nei topi  $\Delta$ Ex44-corretti il 10% della CK dei topi  $\Delta$ Ex44 non corretti, dimostrando così come le fibre muscolari  $\Delta$ Ex44-corrette siano resistenti ai danni indotti dalla corsa in discesa.

Valutato il livello di rigenerazione del muscolo scheletrico e l'integrità delle fibre muscolari, per verificare che le fibre muscolari dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti mantengano la loro funzione a seguito della lesione cronica provocata dalla corsa si è eseguito un test di forza di presa per gli arti posteriori a cui è seguita un'analisi elettrofisiologica ex vivo dell'estensore lungo delle dita (EDL) e dei muscoli del soleo (Figura 4E).

I risultati hanno mostrato una riduzione della forza del 40% nei  $\Delta$ Ex44 rispetto ai WT dopo la corsa in discesa, a differenza dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti che hanno mostrato valori indistinguibili dai WT, confermando un mantenimento della funzione dei muscoli scheletrici  $\Delta$ Ex44-corretti. I risultati dell'analisi elettrofisiologica in vivo hanno confermato ciò mostrando una diminuzione delle forze specifiche massime unicamente nei  $\Delta$ Ex44 rispetto ai WT, nello specifico del 65%, mentre nei  $\Delta$ Ex44-corretti era equivalente rispetto i controlli WT (Figura 4F).



**Figura 4:**

(A) protocollo corsa forzata in discesa.

(B) H&E dei muscoli del quadricipite proveniente da topi WT,  $\Delta$ Ex44, e  $\Delta$ Ex44-corretti, sia di condizioni sedentarie che dopo protocollo di corsa in discesa.

(C) Quantificazione dei nuclei centralizzati in topi sedentari e dopo protocollo di corsa in discesa nei muscoli dei quadricipiti.

(D) Quantificazione dell'area necrotica in muscoli di quadricipite di topi sedentari o dopo protocollo di corsa.

(E) Test di forza di presa dopo 4 settimane di protocollo di corsa in discesa.

(F) forza specifica generate dall'estensore lungo delle dita (EDL) e dai muscoli del soleus dopo 4 settimane di corsa in discesa.

Si è ulteriormente dimostrato il beneficio funzionale della correzione genetica della distrofina grazie all'editing genetico CRISPR-Cas9 nei topi  $\Delta$ Ex44-corretti con:

- l'IHC che con anticorpi per la rivelazione della distrofina nei TA, quadricipiti, EDL, e muscoli del soleo in topi sedentari e post protocollo di corsa forzata in discesa, ha mostrato come più del 75% delle fibre muscolari  $\Delta$ Ex44-corrette abbiano ripristinato l'espressione della proteina distrofina.
- L'analisi con il Western blot ha indicato l'assenza dell'espressione di distrofina in topi  $\Delta$ Ex44 sedentari e dopo corsa in discesa; mentre nei topi  $\Delta$ Ex44-corretti sedentari c'era più del 30% di recupero della proteina distrofina nei vari gruppi

muscolari rispetto al WT. Tali valori di distrofina nei muscoli  $\Delta$ Ex44-corretti sono rimasti costanti dopo il protocollo di corsa in discesa.

Coerentemente con questi risultati, a livello genetico si è osservata una non diminuzione sia degli INDEL nei siti on-target che del genoma virale AAV9-SpCas9 nel quadricipite dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti dopo la corsa in discesa. L'editing genico mediato da CRISPR/Cas9 nei topi  $\Delta$ Ex44 ha pertanto ripristinato l'espressione della distrofina, prevenuto i danni muscolari e fornito benefici funzionali a seguito di una lesione cronica.

### 3.2 Il gene editing con CRISPR/Cas9 normalizza il trascrittoma dei muscoli scheletrici corretti $\Delta$ Ex44

Da lavori precedenti presenti in letteratura abbiamo la dimostrazione che la correzione tramite CRISPR/Cas9 del gene della distrofina porta alla riformazione del DCG funzionale sul sarcolemma, il quale ha la funzione di preservare l'integrità delle fibre muscolari e partecipare nella trasduzione del segnale meccanico. Nei muscoli scheletrici DMD corretti, era sconosciuto se i pathway di espressione genici a valle della formazione del complesso DCG venissero correttamente ripristinati. Pertanto, in questo studio sono stati comparati i profili d'espressione genica dei quadricipiti provenienti da topi WT,  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti tramite analisi di sequenziamento dell'RNA (RNA-seq).

Dai muscoli dei quadricipiti di topi  $\Delta$ Ex44 sedentari dell'età di 4 settimane sono stati identificati, rispetto ai muscoli di topi WT, 1222 geni sovraregolati e 216 sottoregolati (Figura 5A). L'analisi di Gene Ontology (GO) ha rivelato che i geni sovraregolati erano categorizzati come geni della risposta immunitaria innata e adattativa, chemiotassi, risposte cellulari all'interferone gamma. La sovraregolazione di questa categoria di geni è coerente col fatto che nella DMD il danneggiamento della membrana muscolare richiama l'assorbimento di detriti cellulari da parte del sistema dell'immunità innata e successivamente le citochine rilasciate andranno ad attivare l'immunità adattativa. L'analisi di GO, d'altra parte, ha rivelato che i geni sottoregolati erano coinvolti nelle giunzioni cellulari, nel disco Z, nella banda I, e nell'assemblaggio del filamento fino del muscolo scheletrico. La sottoregolazione di questi geni è coerente con la persistente degenerazione dei muscoli scheletrici DMD.

Per determinare gli effetti del gene editing sono stati comparati i trascrittomi dei muscoli quadricipiti provenienti da topi WT,  $\Delta$ Ex44 con quelli da topi  $\Delta$ Ex44-corretti. Paragonati con i quadricipiti  $\Delta$ Ex44, quelli  $\Delta$ Ex44-corretti mostravano 187 geni sovraregolati e 1,142 sottoregolati. I geni sovraregolati in questa analisi di GO erano legati alle miofibrille, al complesso muscolare della miosina, e ai componenti integrali di membrana; i geni sottoregolati invece all'attivazione delle cellule T, alla regolazione della produzione di citochine, alla regolazione della fagocitosi e alla superfamiglia di citochine produttori il fattore di necrosi tumorale (figura 5B).

Pertanto, il gene editing tramite CRISPR/Cas9 della mutazione  $\Delta$ Ex44 ha normalizzato il fenotipo DMD a livello del trascrittoma.

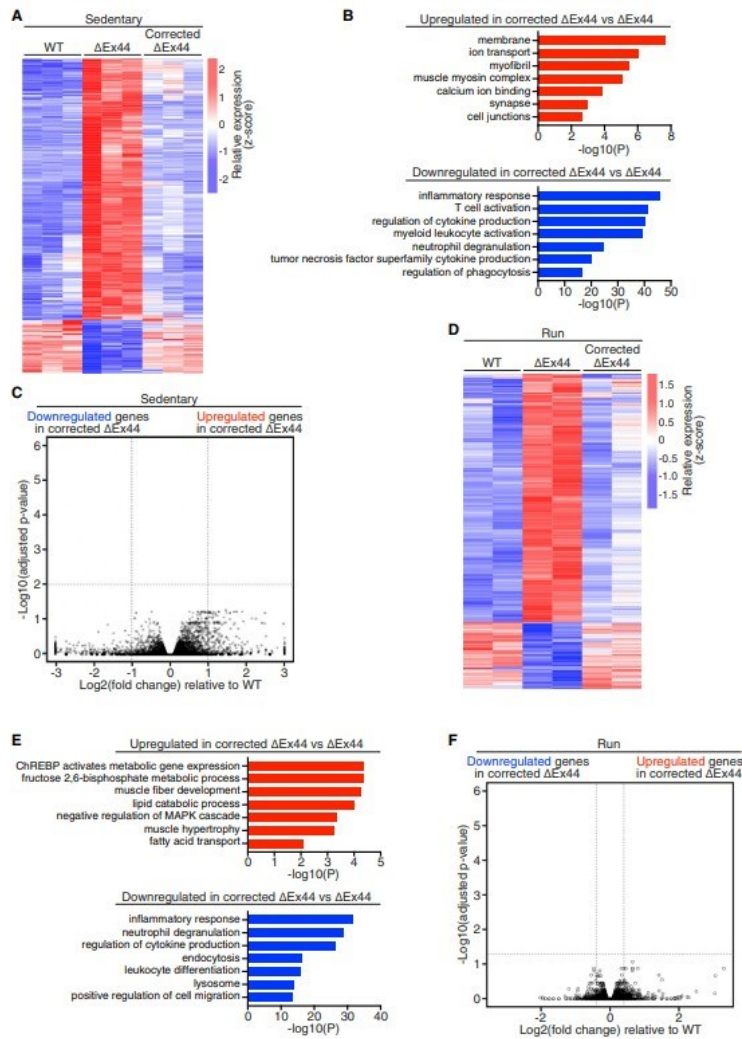
In accordo con tali risultati l'analisi dell'espressione genica differenziale dei trascrittomi dei muscoli quadricipiti di topi WT e  $\Delta$ Ex44-corretti ha rivelato una non significativa differenza di espressione genetica (Figura 5C). Consistentemente a ciò, l'analisi delle componenti principali (PCA) ha rivelato un'alta differenza tra i trascrittomi dei muscoli dei quadricipiti dei WT e  $\Delta$ Ex44, mentre i trascrittomi dei WT e  $\Delta$ Ex44-corretti risultavano altamente simili.

Dopo aver svolto queste analisi su topi sedentari si è voluto valutare se la normalizzazione dell'espressione genica dei muscoli DMD  $\Delta$ Ex44-corretti viene mantenuta anche a seguito di stress cronico provocato dalla corsa forzata in discesa. Si sono quindi condotte le analisi di RNA-seq nei muscoli dei quadricipiti di topi di 8 settimane d'età WT,  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti, a seguito del protocollo di 4 settimane di corsa forzata in discesa (Figura 5D).

L'analisi dell'espressione genica differenziale ha rivelato, dal confronto del trascrittoma dei topi  $\Delta$ Ex44 rispetto a quello dei WT, 679 geni sovraregolati e 149 sottoregolati. L'analisi GO ha mostrato che i geni sovraregolati erano correlati ai processi del sistema immunitario, fagocitosi, e componenti del lato esterno della membrana plasmatica; mentre i geni sottoregolati erano correlati alla membrana, alle giunzioni cellulari e alle proiezioni neuronali. Queste differenze trascrizionali sono coerenti con l'aumento del danneggiamento muscolare e dell'area di necrosi nei muscoli del quadricipite in topi  $\Delta$ Ex44 dopo il protocollo di corsa in discesa.

Comparando i trascrittomi dei quadricipiti tra i topi  $\Delta$ Ex44-corretti e  $\Delta$ Ex44 dopo il protocollo di corsa in discesa si sono rilevati 510 geni disregolati (Figura 5D). I geni sottoregolati nel muscolo del quadricipite  $\Delta$ Ex44-corretti sono correlati a geni della risposta infiammatoria, lisosomi e deposizione di matrice extra-cellulare (Figura 6E). Questa sotto regolazione genetica indica come l'editing genomico CRISPR/Cas9 preserva l'integrità delle fibre muscolari anche dopo lo svolgimento del protocollo di corsa in discesa forzata. Questi risultati sono pertanto coerenti con quelli precedentemente descritti e mostrati con l'analisi istologica e funzionale muscolare (Figura 4). Interessante notare come i geni sovraregolati nei muscoli quadricipiti dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti sono correlati all'attività della chinasi MAP (MAPK), al metabolismo lipidico e glucidico e allo sviluppo delle fibre muscolari (Figura 5E). Nel muscolo normale la corsa in discesa aveva mostrato l'attivazione di MAPK e del *signaling* a valle che promuove l'utilizzazione di grasso e glucosio in modo da soddisfare la domanda di incremento metabolico. Nei muscoli DMD i ripetuti danni al sarcolemma non permettono alle fibre muscolari di adattarsi adeguatamente alla corsa e attivare tale pathway. Pertanto, questi risultati suggeriscono che l'espressione della distrofina geneticamente editata è sufficiente per preservare l'integrità delle fibre muscolari e per permettere i giusti adattamenti alla corsa.





**Figura 5:** (A) Heatmap dell'espressione genica differenziale nel muscolo di quadricipite di topi di quattro settimane d'età. (B) L'analisi di GO mostra i geni up- e down-regolati nel muscolo quadricipite  $\Delta$ Ex44-corretto rispetto al muscolo quadricipite  $\Delta$ Ex44. (C) Volcano plot dei geni differenzialmente espressi tra i muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti e WT. (D) Heatmap dei geni differenzialmente espressi nei quadricipiti di topi di 8 settimane dopo 4 settimane di corsa in discesa. (E) L'analisi di GO mostra i geni up- e down-regolati nel muscolo quadricipite  $\Delta$ Ex44-corretto dopo la corsa in discesa rispetto al muscolo quadricipite  $\Delta$ Ex44. (F) Volcano plot dei geni differenzialmente espressi tra i muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti dopo la corsa in discesa e i WT.

Per assicurare il corretto recupero trascrizionale in topi  $\Delta$ Ex44-corretti dopo corsa in discesa si sono comparati anche i geni differenzialmente espressi tra i muscoli del quadricipite di topi WT e di topi  $\Delta$ Ex44-corretti dopo la corsa in discesa. L'analisi dell'espressione genica differenziale ha rivelato una non significativa differenza di espressione di geni tra i due gruppi (Figura 5F). Per validare questi risultati è stata condotta infine una PCA sui muscoli del quadricipite di topi WT,  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti dopo protocollo di corsa in discesa mostrando come i trascrittomi dei muscoli del quadricipite  $\Delta$ Ex44 e  $\Delta$ Ex44-corretti fossero altamente divergenti, mentre quelli tra WT e  $\Delta$ Ex44-corretti siano raggruppati vicini e quindi simili.

Pertanto, i risultati dell'RNA-seq indicano che il genome editing con CRISPR-Cas9 sulla mutazione  $\Delta$ Ex44 permetta il recupero del corretto trascrittoma nei muscoli DMD e come l'omeostasi trascrizionale sia preservata anche a seguito di iniezioni croniche causate dalla corsa in discesa.

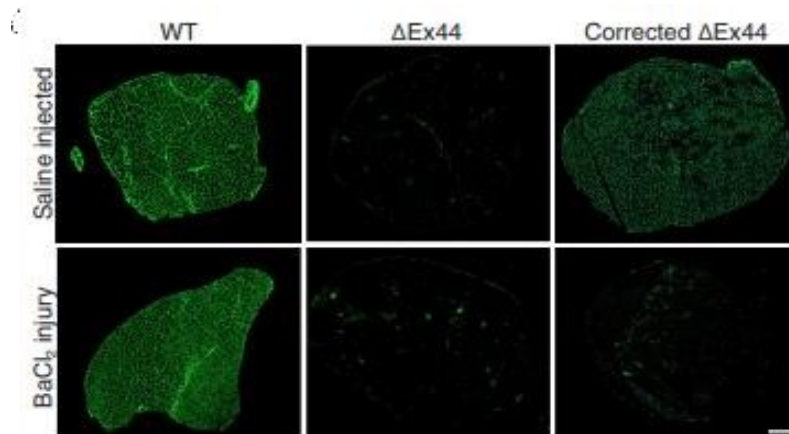
### 3.3 La distruzione delle miofibre risulta nella perdita di espressione della distrofina geneticamente editata

Recentemente era stato riportato che AAV9 può trasdurre anche le cellule satelliti muscolari grazie anche alla presenza del promotore muscolo-specifico CK8e il quale mostrava una certa attività in queste cellule, anche se il livello di attività non è ancora ben definito.

L'iniezione muscolare di BaCl<sub>2</sub> risulta in una rapida ablazione delle fibre muscolari, la quale è seguita dalla rigenerazione di queste tramite l'attivazione delle cellule satelliti. Per determinare se anche le cellule satellite attivate fossero state oggetto di genome editing tramite CRISPR-Cas9 si è andati a valutare se dopo l'ablazione con BaCl<sub>2</sub>, le fibre muscolari rigenerate mostravano l'espressione della distrofina geneticamente corretta.

Lo studio è iniziato con l'iniezione nel muscolo TA in topi di 3 mesi di età WT, ΔEx44 e ΔEx44-corretti di BaCl<sub>2</sub> inducendo così l'ingiuria acuta. Due mesi dopo l'iniezione di BaCl<sub>2</sub> è stata svolta l'analisi H&E sui muscoli TA. Questa analisi ha mostrato per i topi WT fibre muscolari con la presenza di nuclei centralizzati e nessuna area di necrosi, fattori indicativi di una forte rigenerazione. Invece per i muscoli TA dei topi ΔEx44-corretti erano presenti delle piccole aree necrotiche simili a quelle ritrovate nei muscoli TA dei topi ΔEx44 non corretti, suggerendo una scorretta rigenerazione muscolare. Per determinare se l'alterata rigenerazione muscolare fosse determinata da una perdita dell'editing genetico nei nuclei muscolari, è stata svolta un'analisi genomica dei due muscoli TA ΔEx44-corretti del topo iniettando la soluzione di BaCl<sub>2</sub> su uno e una soluzione salina nell'altro. Quest'ultima è usata come controllo. Nei muscoli TA ΔEx44-corretti che erano stati iniettati con la soluzione salina sono stati riscontrati 20% di INDELS all'interno dell'esone 45. D'altra parte, invece non sono stati rilevati INDELS nei muscoli TA ΔEx44-corretti iniettati con la soluzione di BaCl<sub>2</sub>. Questo dato suggeriva pertanto la completa perdita completa del gene editing da parte di CRISPR/Cas9 dopo iniezione di BaCl<sub>2</sub>.

Coerentemente con questi risultati l'IHC ha mostrato la perdita di quasi tutte le fibre muscolari distrofina-positivo nei muscoli TA ΔEx44-corretti dopo trattamento con BaCl<sub>2</sub> rispetto al controllo con l'iniezione con soluzione salina (Figura 6).

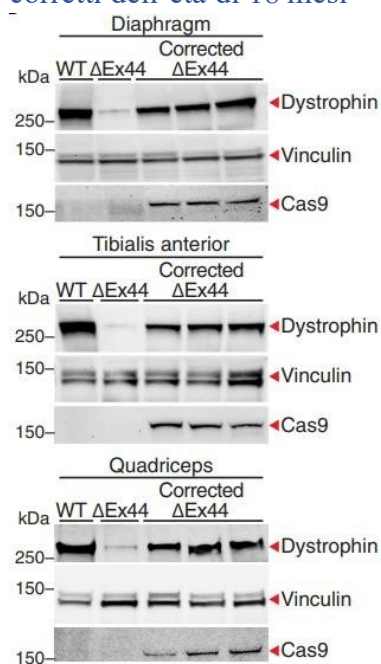


**Figura 6:** IHC mostra la perdita delle fibre distrofina-positivo nei topi ΔEx44-corretti dopo somministrazione BaCl<sub>2</sub>.

L'analisi al Western Blot ha mostrato dei livelli di distrofina inferiori del 5% nei muscoli TA  $\Delta$ Ex44-corretti a seguito del danno acuto; e l'ulteriore conferma, è stata la mancata presenza dei genomi virali ssAAV-SpCas9 nei muscoli TA  $\Delta$ Ex44-corretti trattati con BaCl<sub>2</sub>.

Insieme questi risultati suggeriscono che le cellule satelliti non sono efficacemente modificate dalle strategie di delivery con AAV9 nei nostri esperimenti; e pertanto si ottiene che a seguito dell'ingiurie provocate da BaCl<sub>2</sub> il gene editing portato da CRISPR/Cas9 nei nuclei delle miofibre muscolari viene perso. Le cellule satelliti non corrette portano quindi a una perdita dell'espressione della distrofina geneticamente corretta.

### 3.4 L'espressione della distrofina geneticamente editata è sostenuta in topi $\Delta$ Ex44 corretti dell'età di 18 mesi



Per determinare se la distrofina geneticamente corretta fosse espressa per tutta la vita dei topi  $\Delta$ Ex44-corretti si sono svolte delle analisi su topi dell'età di 18 mesi. L'IHC nei topi  $\Delta$ Ex44 non mostrava fibre positive alla distrofina nei muscoli del diaframma, TA e quadricipite. Al contrario più del 90% delle fibre muscolari di questi campioni in topi  $\Delta$ Ex44-corretti risultavano distrofina-positivi. Coerentemente con questi risultati le analisi al Western blot (Figura 7) non hanno rilevato distrofina nei muscoli scheletrici  $\Delta$ Ex44, mentre c'era un recupero di espressione della distrofina maggiore del 40% nei muscoli  $\Delta$ Ex44-corretti del diaframma, TA e quadricipiti rispetto ai WT.

**Figura 7:** Analisi Western blot mostra l'espressione di distrofina e SpCas9 nei muscoli in topi  $\Delta$ Ex44-corretti di 18 mesi. La Vinculina è stata caricata come controllo.

Per determinare invece se l'editing genomico con CRISPR/Cas9 può recuperare la degenerazione muscolare che si presenta in topi  $\Delta$ Ex44 di 18 mesi d'età è stata svolta un'analisi H&E dei muscoli del diaframma, TA e quadricipite. Nei topi  $\Delta$ Ex44-corretti è stata osservata una percentuale di necrosi minore dell'1% e nelle fibre muscolari erano presenti meno del 10% di nuclei centralizzati.

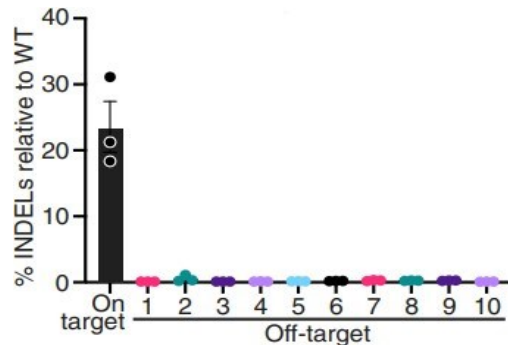
Insieme questi risultati dimostrano quindi come l'espressione della distrofina geneticamente editata si sia mantenuta nel tempo e come prevenga la degenerazione muscolare in topi  $\Delta$ Ex44-corretti di 18 mesi di età.

### 3.5 Analisi dell'espressione di SpCas9 e gene editing in topi di 18 mesi d'età

In aggiunta all'espressione sostenuta di distrofina nel tempo, si è osservata una significativa espressione di SpCas9 nei topi  $\Delta$ Ex44-corretti di 18 mesi d'età. Per determinare gli effetti a lungo termine di SpCas9 nei muscoli scheletrici si è svolto

un sequenziamento profondo dopo PCR da DNA genomico isolato da muscolo TA  $\Delta$ Ex44-corretto di 18 mesi.

Si è osservata una formazione del 23.5% di INDELS nell'esone 45 nel gene Dmd



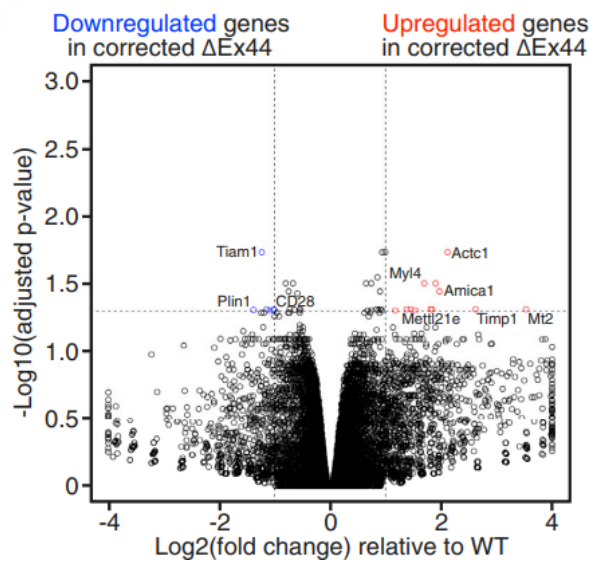
**Figura 8:** Analisi degli INDEL nel sito on-target e nei principali 10 siti off-target nei muscoli TA  $\Delta$ Ex44-corretti di 18 mesi d'età.

(Figura 8). L'analisi di *Tracking of Indels by Decomposition* (TIDE) ha indicato che c'era un aumento totale del 15% degli INDELS on-target rispetto a quelli riscontrati nei TA  $\Delta$ Ex44-corretto di 4 settimane. Approssimativamente l'80% di questi INDELS erano o delle inserzioni a singolo nucleotide o delle delezioni di due nucleotidi a livello del

sito di taglio a doppio filamento di DNA previsto. Queste inserzioni e delezioni riportavano al corretto frame di lettura il trascritto della distrofina. Inoltre, usando gli strumenti di progettazione CRISPR (Benchling), sono stati determinati i principali 10 siti off-target, non sono stati però osservati INDELS significativi in questi. (Figura 8). In aggiunta è stata osservata una percentuale minore dell'1% di genoma AAV integrato nel sito target e nessuna integrazione nei potenziali siti off-target. La percentuale di siti off-target e di AAV integrato è simile a quella riportata nei muscoli TA  $\Delta$ Ex44-corretti di 4 settimane. Questo dato suggerisce che l'espressione di SpCas9 sostenuta nel tempo non risulta in editing significativi in siti off-target.

### 3.6 L'omeostasi trascrizionale viene mantenuta nel muscolo scheletrico $\Delta$ Ex44-corretto di 18 mesi

Per determinare la longevità dell'omeostasi trascrizionale mediata da CRISPR/Cas9, è stato eseguito l'RNA-seq dei muscoli quadricipiti di topi di 18 mesi. Nei muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44, comparati con i WT, c'erano 1,571 geni sovraregolati e 524 geni sottoregolati. L'analisi GO dei geni sovraregolati li ha correlati a geni coinvolti nei processi del sistema immunitario, della regolazione positiva del fattore di necrosi tumorale e della trasduzione del segnale. Invece, i geni sottoregolati erano correlati alla membrana, all'attività dei canali ionici, e alla contrazione muscolare. Questi risultati sono coerenti con la severa degenerazione muscolare osservata nei muscoli scheletrici dei topi  $\Delta$ Ex44 di 18 mesi. A seguire si è comparato il trascrittoma dei muscoli quadricipiti provenienti da topi di 18 mesi  $\Delta$ Ex44-corretti rispetto a quello  $\Delta$ Ex44. Si sono trovati 193 geni sovraregolati e 526 sottoregolati nei muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti. L'analisi GO in questo caso ha correlato i geni sovraregolati ai processi del metabolismo del glicogeno, giunzioni cellulari, attività canali ionici, reticolo sarcoplasmatico e sinapsi. I geni sottoregolati erano correlati invece con la regione extra-cellulare, l'adesione cellulare, la differenziazione delle cellule lipidiche. Questi risultati suggeriscono che le fibre muscolari  $\Delta$ Ex44-corrette sono ampiamente intatte e non sono state sostituite da tessuto adiposo o aree fibrotiche, cosa si era osservato anche dall'analisi istologica.



**Figura 9:** Volcano plot della differenza di espressione di geni tra quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti e WT di topi di 18 mesi.

(Plin1 e Tiam1). Si è osservata anche la sottoregolazione di Cd28, caratteristica nelle infiammazioni croniche.

Questi risultati indicano come in risposta al danno delle fibre muscolari vi sia l'attivazione del sistema immunitario; ma considerando il piccolo numero di geni disregolati possiamo capire che l'infiammazione dei muscoli del quadricipite  $\Delta$ Ex44-corretto è lieve. Anche nel grafico dell'analisi PCA si è riscontrata infatti una piccola distanza tra i campioni  $\Delta$ Ex44-corretti e quelli WT, suggerendo così che, il salvataggio trascrizionale osservato nel muscolo scheletrico  $\Delta$ Ex44-corretto persiste con l'invecchiamento.

### 3.7 Discussione

L'editing genetico mediante CRISPR/Cas9 per ripristinare l'espressione della distrofina nei muscoli scheletrici di topi modello DMD è descritto in numerosi studi, ma la durata di tale modifica a seguito di danni cronici non è stata ancora ampiamente analizzata. La corsa su tapis roulant in discesa ad alta velocità esacerba il fenotipo del muscolo scheletrico DMD in topi privi di distrofina. Viceversa, questo studio dimostra che il muscolo scheletrico  $\Delta$ Ex44 geneticamente modificato tramite CRISPR/Cas9 è resistente ai danni indotti dalla corsa in discesa. L'espressione della proteina distrofina a seguito del gene-editing è mantenuta anche in seguito a lesioni croniche.

Dai lavori precedenti si sapeva come bastasse il ripristino del 15% della proteina distrofina per mantenere l'integrità della fibra muscolare nei topi mdx. Nel muscolo scheletrico  $\Delta$ Ex44-corretto, si è osservato un recupero dell'espressione della distrofina maggiore del 30% rispetto ai livelli normali in quasi tutti i gruppi muscolari. La distrofina corretta era espressa a sufficienza per stabilizzare il sarcolemma delle fibre muscolari  $\Delta$ Ex44-corrette e ripristinare il DGC.

Nel presente studio, i trascrittomi del muscolo scheletrico  $\Delta$ Ex44-corretto e WT sono indistinguibili dopo la lesione cronica, dimostrando il ripristino anche della trasduzione del segnale meccanico a valle del DGC nel muscolo  $\Delta$ Ex44-corretto. Il

Per valutare l'estensione dell'entità del recupero trascrizionale, si sono confrontati infine i trascrittomi dei muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti e WT di 18 mesi. Si è visto che solo 18 geni erano disregolati nei muscoli quadricipiti  $\Delta$ Ex44-corretti rispetto a WT (Figura 9). Tra i geni sovraregolati si hanno geni codificanti per processi del sistema immunitario (Timp1, Lcn2, Mt2, Ccl6, e Nox4) e geni per la rigenerazione delle fibre muscolari (Myh3, Myl4, e Actc1). I geni sottoregolati invece sono coinvolti nell'utilizzazione dell'energia

ritorno dell'omeostasi trascrizionale permette l'adattamento alle contrazioni eccentriche indotte dalla lesione cronica. Insieme, questi risultati suggeriscono che l'editing del genoma con CRISPR/Cas9 può preservare l'integrità delle fibre muscolari e il suo potenziale terapeutico nei muscoli DMD.

Si osserva inoltre un ripristino superiore del 40% della proteina distrofina dopo 18 mesi, dimostrando la stabilità delle miofibre geneticamente modificate. La strategia in vivo CRISPR/Cas9 sfrutta il promotore muscolo-specifico CK8e per guidare l'espressione di SpCas9. Il promotore CK8e, però, non è molto attivo nelle cellule staminali muscolari e quindi ci si aspetta una diminuzione dell'espressione della distrofina con l'invecchiamento. Infatti, le cellule staminali residenti non oggetto della modifica genetica si fonderanno con fibre muscolari DMD-corrette.

Con il proseguire della vita dei topi aumenta la formazione INDELS sui siti bersaglio. Poiché nei topi di 18 mesi è mantenuta un'espressione significativa di SpCas9, è possibile che l'espressione sostenuta di SpCas9 risulti in un editing dei nuclei muscolari di nuova costituzione. Ciò solleva una potenziale preoccupazione: l'aumento della modifica del genoma nei siti off-target col trascorrere del tempo. Di contro, tale studio ha mostrato come nel muscolo TA  $\Delta$ Ex44-corretto di 18 mesi sono stati osservati meno dell'1% di siti off-target per l'editing genetico, meno dell'1% d'integrazione di AAV nel locus target e nessuna integrazione di AAV è stata osservata nei principali 10 siti off-target previsti. I bassi tassi di modifica off-target, combinati con la natura post-mitotica del muscolo scheletrico, riducono la probabilità di trasformazioni maligne risultanti da editing genico sistemico nel lungo termine.

I risultati di questo studio supportano la letteratura esistente sui benefici a lungo termine che l'editing genetico con CRISPR/Ca9 può conferire nella DMD. L'efficacia clinica e la sicurezza di AAV9 erano già state dimostrate in studi di terapia genica di successo nella SMA, tuttavia rimane il fatto che, AAV può essere somministrato in modo efficace solamente una volta a causa del successivo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo umorale al vettore. I risultati di tale studio suggeriscono che una singola dose di AAV sia sufficiente per mantenere l'espressione della distrofina geneticamente modificata nel lungo termine.

A partire da questi risultati sulla longevità d'espressione, l'interesse ora sarà il monitoraggio dell'espressione a lungo termine della distrofina geneticamente modificata in modelli DMD mammiferi più grandi rispetto al topo, in cui la progressione della degenerazione delle fibre muscolari sia molto più grave rispetto al modello murino.

In questo studio, si è inoltre dimostrato come l'editing del genoma con CRISPR/Cas9 protegga il muscolo scheletrico  $\Delta$ Ex44 da lesioni croniche causate dalla corsa in discesa, mentre il danno acuto indotto da BaCl<sub>2</sub> comporta la perdita del gene editing sulla distrofina nonostante i recenti studi abbiano dimostrato la capacità di AAV9 di trasdurre cellule satelliti.

Una spiegazione può essere che avendo:

- un promotore CK8e che mostra una bassa attività nelle cellule satelliti
- un tropismo relativamente basso di AAV9 per le cellule satelliti stesse

la combinazione di questi due fattori assieme risulti in un editing genetico inefficiente nelle cellule satelliti dei topi  $\Delta$ Ex44 corretti.

Pertanto, a seguito della lesione con  $BaCl_2$  possiamo dedurre che il muscolo è stato probabilmente ricostituito da cellule satelliti non modificate; per questo abbiamo osservato poca o nessuna espressione di distrofina in tale contesto.

Questa considerazione potrà spingere la ricerca nella progettazione di un promotore, il quale sia altamente attivo nel muscolo scheletrico così come nelle cellule satelliti. Il bisogno della costruzione di promotori nuovi è dovuto all'impossibilità di usare promotori espressi in modo ubiquitario (come ad esempio il CMV), in quanto porterebbero a un accumulo elevato di Cas9 e quindi il verificarsi di eventi di editing in tessuti non bersaglio.

Nonostante il danno acuto abbia provocato la perdita della distrofina geneticamente modificata, si è comunque dimostrato il potenziale dell'editing del genoma mediante CRISPR/Cas9 come terapia a lungo termine per la DMD inoltre bisogna considerare che la lesione indotta da  $BaCl_2$  è maggiormente acuta e grave rispetto a quella che si riscontra nella DMD. Nei nostri studi, infatti, il modello murino è stato posto a stress fisiologicamente rilevanti, in modo da simulare le lesioni croniche e dell'invecchiamento: si sono notati nei muscoli corretti nuclei non centralizzati e una proteina distrofina che mantiene la modifica genetica apportata, confermando il successo terapeutico di CRISPR-Cas9.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

Ordine alfabetico cognome autore.

- Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med.* 2008 Jul;10(7):717-33.
- Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol.* 2015 Jul 1;5(3):1027-59.
- Karri DR, Zhang Y, Chemello F, Min YL, Huang J, Kim J, Mammen PPA, Xu L, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Long-term maintenance of dystrophin expression and resistance to injury of skeletal muscle in gene edited DMD mice. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022 Mar 8;28:154-167.
- Lau CH, Suh Y. *In vivo* genome editing in animals using AAV-CRISPR system: applications to translational research of human disease. *F1000Res.* 2017 Dec 20;6:2153.
- Min YL, Li H, Rodriguez-Caycedo C, Mireault AA, Huang J, Shelton JM, McAnally JR, Amoasii L, Mammen PPA, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci Adv.* 2019 Mar 6;5(3):eaav4324.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 2008 Jun;16(6):1073-80.

# Long-term maintenance of dystrophin expression and resistance to injury of skeletal muscle in gene edited DMD mice

Dileep R. Karri,<sup>1,2,3</sup> Yu Zhang,<sup>1,2,3</sup> Francesco Chemello,<sup>1,2,3</sup> Yi-Li Min,<sup>1,2,3,6</sup> Jian Huang,<sup>2,4</sup> Jiwoong Kim,<sup>5</sup> Pradeep P.A. Mammen,<sup>2,4</sup> Lin Xu,<sup>5</sup> Ning Liu,<sup>1,2,3</sup> Rhonda Bassel-Duby,<sup>1,2,3</sup> and Eric N. Olson<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA; <sup>2</sup>Senator Paul D. Wellstone Muscular Dystrophy Cooperative Research Center, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA; <sup>3</sup>Hamon Center for Regenerative Science and Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA; <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA; <sup>5</sup>Quantitative Biomedical Research Center, Department of Population and Data Sciences, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal muscle disease caused by mutations in the dystrophin gene. CRISPR/Cas9 genome editing has been used to correct DMD mutations in animal models at young ages. However, the longevity and durability of CRISPR/Cas9 editing remained to be determined. To address these issues, we subjected DEx44 DMD mice to systemic delivery of AAV9-expressing CRISPR/Cas9 gene editing components to reframe exon 45 of the dystrophin gene, allowing robust dystrophin expression and maintenance of muscle structure and function. We found that genome correction by CRISPR/Cas9 confers lifelong expression of dystrophin in mice and that corrected skeletal muscle is highly durable and resistant to myofiber necrosis and fibrosis, even in response to chronic injury. In contrast, when muscle fibers were ablated by barium chloride injection, we observed a loss of gene edited dystrophin expression. Analysis of on- and off-target editing in aged mice confirmed the stability of gene correction and the lack of significant off-target editing at 18 months of age. These findings demonstrate the long-term durability of CRISPR/Cas9 genome editing as a therapy for maintaining the integrity and function of DMD muscle, even under conditions of stress.

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked disorder that affects 1 in 5,000 boys worldwide. The disease is caused by the loss of dystrophin, a large sarcolemma protein that connects the actin cytoskeleton network to the extracellular matrix.<sup>1,2</sup> In addition, dystrophin interacts with sarcospan, the sarcoglycan complex, dystroglycan, syntrophin, alpha-dystrobrevin, and nitric oxide synthase to form the dystrophin-glycoprotein complex (DGC), which participates in mechanotransduction, muscle growth, and calcium handling.<sup>3</sup> The dystrophin protein consists of a N-terminal actin binding domain, 24 spectrin-like repeats, a cysteine-rich region, and a C-terminal scaffold. During muscle contraction, dystrophin functions to transduce force across the sarcolemma and maintains membrane integrity. In the absence of dystrophin, muscle fibers

degenerate and are especially susceptible to contraction-induced injury.<sup>2</sup> DGC components are also lost or mislocalized in muscles affected by DMD, and signaling downstream of the DGC is disrupted.<sup>4–7</sup> Consequently, DMD muscle is unable to adapt to increased use and undergoes progressive damage and degeneration. As a result of these abnormalities, most DMD patients lose ambulation by the early teenage years and die in the third decade of life due to either dilated cardiomyopathy or respiratory failure.

Over 4,000 mutations in the dystrophin gene (*DMD*) have been identified in DMD patients.<sup>8,9</sup> Approximately 70% of these mutations are exon deletions or duplications that disrupt the *DMD* open reading frame and introduce a premature stop codon, which prevents the production of functional dystrophin protein.<sup>8,9</sup> Many of these mutations are found in a hotspot region containing exons 43–55, which encode the spectrin repeats within the dystrophin protein.<sup>10,11</sup> In contrast to DMD, Becker muscular dystrophy (BMD) patients contain in-frame deletions in exons that encode the spectrin repeats. As a result, these patients express functional, truncated forms of dystrophin and can present with mild or no muscle symptoms.<sup>12</sup> Thus, exon skipping or reframing strategies that bypass or correct out-of-frame exons potentially allow for restoration of the dystrophin open reading frame and conversion of DMD to the milder BMD.

We and others have worked to correct DMD mutations based on CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) gene editing (reviewed in Chemello et al<sup>13</sup>; Coi and Koo<sup>14</sup>; and Olson<sup>15</sup>). In “single-cut” CRISPR editing, a Cas9 nuclease induces a double-strand DNA break (DSB) near the mutation causing DMD. Subsequently, repair of the DSB by non-homologous end-

Received 29 July 2021; accepted 3 March 2022;  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.03.004>.

<sup>6</sup>Present address: Vertex Cell and Genetic Therapies, Boston, MA 02210

Correspondence: Eric N. Olson, Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA.  
E-mail: [Eric.Olson@utsouthwestern.edu](mailto:Eric.Olson@utsouthwestern.edu)



joining (NHEJ) results in the introduction of insertions or deletions (INDELs) that either reframe an out-of-frame exon or cause exon skipping, allowing the preceding exon to splice into downstream in-frame exons.<sup>4,16</sup> These permanent alterations to the mutant DMD allele result in production of a functional dystrophin protein with truncations in the spectrin-like repeats. Using this approach, we have corrected a variety of DMD mutations in animals and cardiomyocytes from patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs).<sup>5,17–20</sup>

Skeletal muscle injury from DMD, as well as chronic use, results in activation of satellite cells residing below the muscle basal lamina, culminating in myofiber regeneration.<sup>21</sup> The extent to which satellite cells contribute to the maintenance of muscle structure and function following CRISPR/Cas9 gene editing is currently unresolved. Efficient gene editing in satellite cells following systemic delivery of gene editing components with adeno-associated virus (AAV) would require efficient AAV infectivity as well as the use of gene regulatory elements that allow for Cas9 expression in this specialized stem cell population.

Recently, it has been shown that dystrophin expression is sustained for 18 months in CRISPR-corrected mdx mice, which harbor a nonsense mutation in exon 23 of the dystrophin gene.<sup>22,23</sup> However, the effects of chronic injury on corrected DMD muscle are unknown. This is a particularly important issue because of the cycles of degeneration and regeneration and known turnover of skeletal muscle fibers in response to injury. To address these issues, we monitored the longevity of dystrophin expression in gene edited mice with a deletion of *Dmd* exon 44 (DEx44), which represents a prominent deletion mutation in humans. Here, we demonstrate that gene edited dystrophin expression is sustained throughout the lifespan of corrected DEx44 mice. In addition, corrected DEx44 muscle was resistant to damage induced by chronic injury resulting from high intensity downhill running. In contrast, severe injury induced by BaCl<sub>2</sub> injection, which causes loss of muscle fibers, resulted in the loss of gene edited dystrophin expression. These results highlight the potential of single-cut CRISPR/Cas9 genome editing for long-term maintenance of skeletal muscle structure and function in DMD.

## RESULTS

### CRISPR/Cas9-mediated "single-cut" gene editing in DEx44 mice prevents skeletal muscle damage induced by downhill running

Forced downhill treadmill running causes severe muscle injury over time to mdx mice.<sup>24,25</sup> To determine whether CRISPR/Cas9 gene edited muscle is resistant to this form of chronic injury, we used a DMD mouse model harboring a deletion of exon 44 in the *Dmd* gene (DEx44).<sup>17</sup> We corrected DEx44 mice by intraperitoneal administration of AAV9-SpCas9 and AAV9-single-guide RNA (sgRNA) at a 1:1 ratio of  $8 \times 10^{13}$  vector genomes (vg)/kg each on postnatal day 4 (P4), as previously described.<sup>19</sup> SpCas9 expression was controlled by the creatine kinase 8 promoter (CK8e), a muscle-specific regulatory element from the MCK gene,<sup>26,27</sup> and sgRNA expression was controlled by three different RNA polymerase III promoters, as pre-

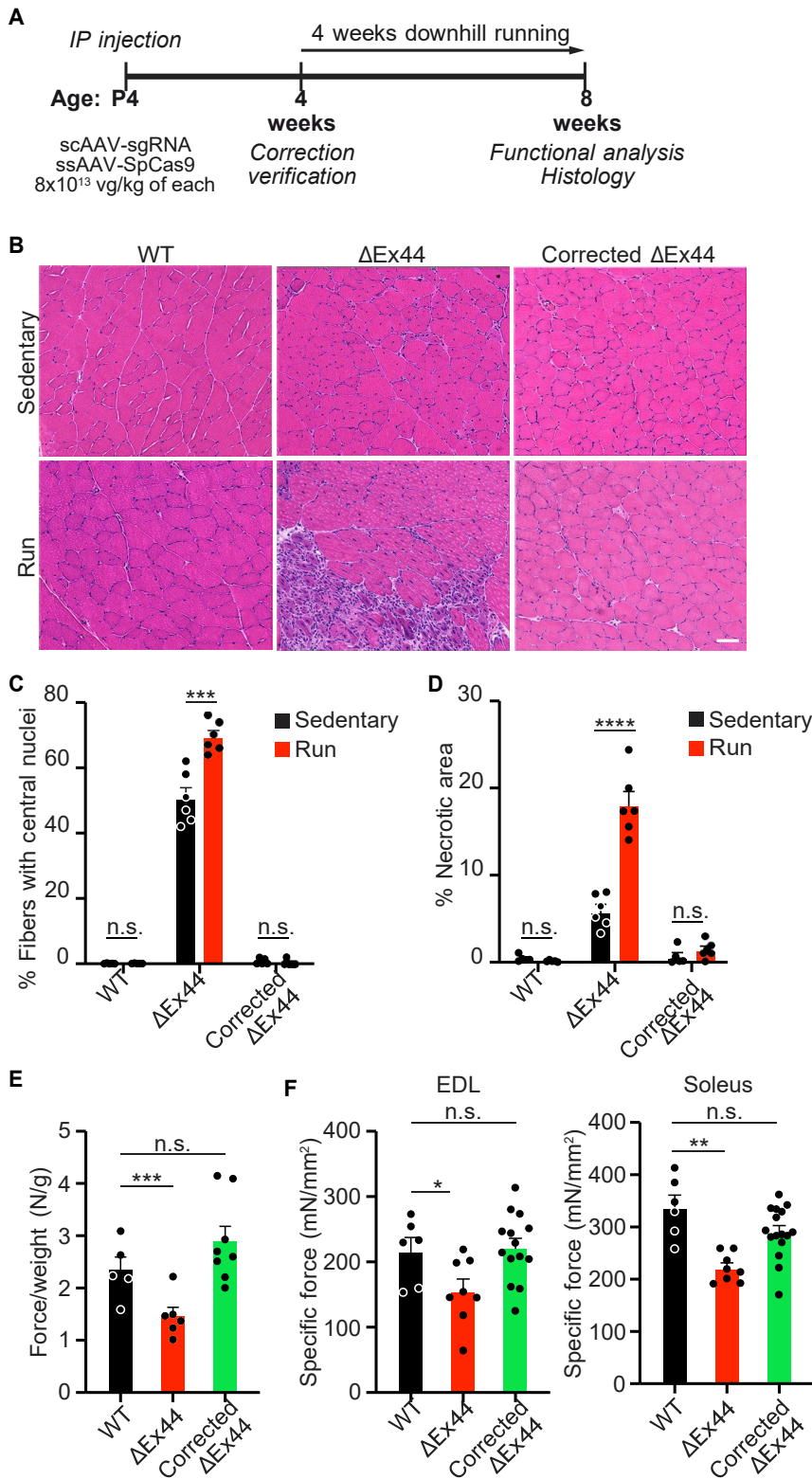
viously described.<sup>4</sup> This strategy induces a single DSB in exon 45 of the *Dmd* gene, and the INDELs generated by NHEJ-mediated DNA repair reframe exon 45, restoring the open reading frame of dystrophin. Exons 44 and 45 encode for spectrin-like repeat 17 of the central rod domain of dystrophin, which is contained within the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) binding site. Therefore, gene editing predominantly produces a near-full-length dystrophin protein that is missing 48 amino acids of the nNOS binding domain.

Immunohistochemistry (IHC) of the tibialis anterior (TA) muscle at 1 month of age showed that >90% of corrected DEx44 muscle fibers expressed dystrophin (Figure S1A). In addition, corrected DEx44 mice exhibited a 90% reduction in serum creatine kinase (CK) activity, an indicator of muscle damage, when compared with uncorrected DEx44 mice (Figure S1B). These results validate the efficient rescue of dystrophin expression in corrected DEx44 mice.

To induce chronic injury, 4-week-old wild-type (WT), DEx44, and corrected DEx44 mice were subjected to a protocol of forced downhill running modified from TREAT-Neuromuscular Disease guidelines (Figure 1A).<sup>24</sup> After downhill running, WT mice did not show centralized nuclei, a marker of skeletal muscle regeneration, or necrosis (Figures 1B–1D and S2). In contrast, DEx44 mice exhibited prominent centralized nuclei and necrosis in the quadriceps, TA, and diaphragm muscles following downhill running (Figures 1B–1D and S2). The DEx44 quadriceps muscle was the most affected, with a 20% increase in centralized nuclei and a 15% increase in necrotic area (Figures 1C, 1D, and S2). Therefore, high-speed downhill running selectively induced skeletal muscle damage and subsequent necrosis in DEx44 mice.

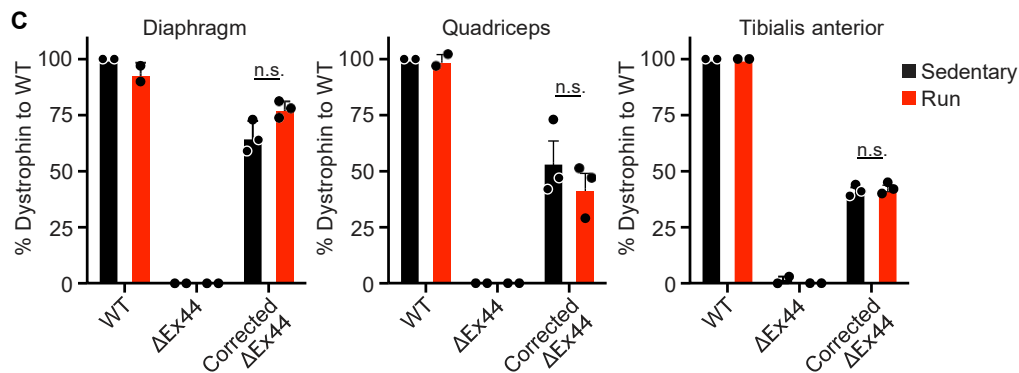
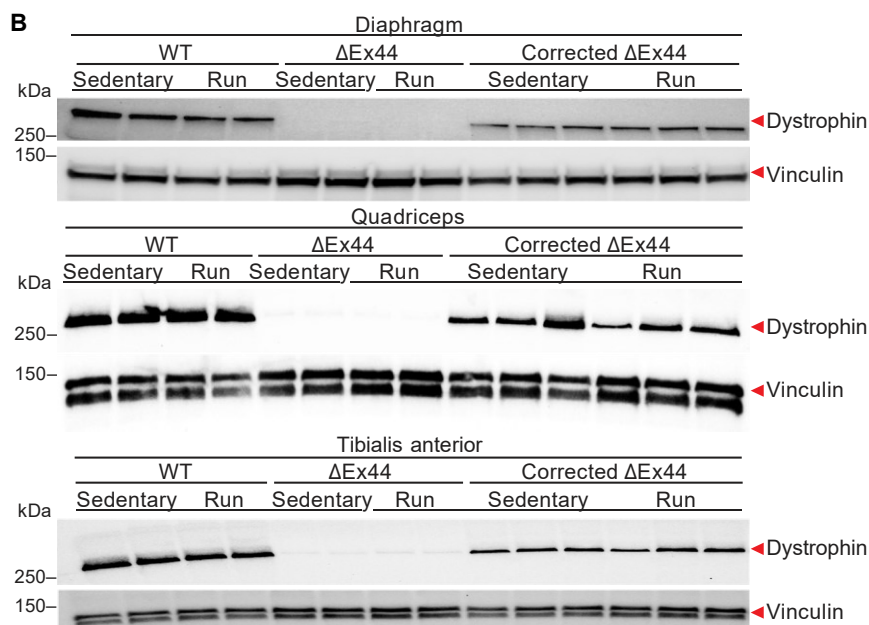
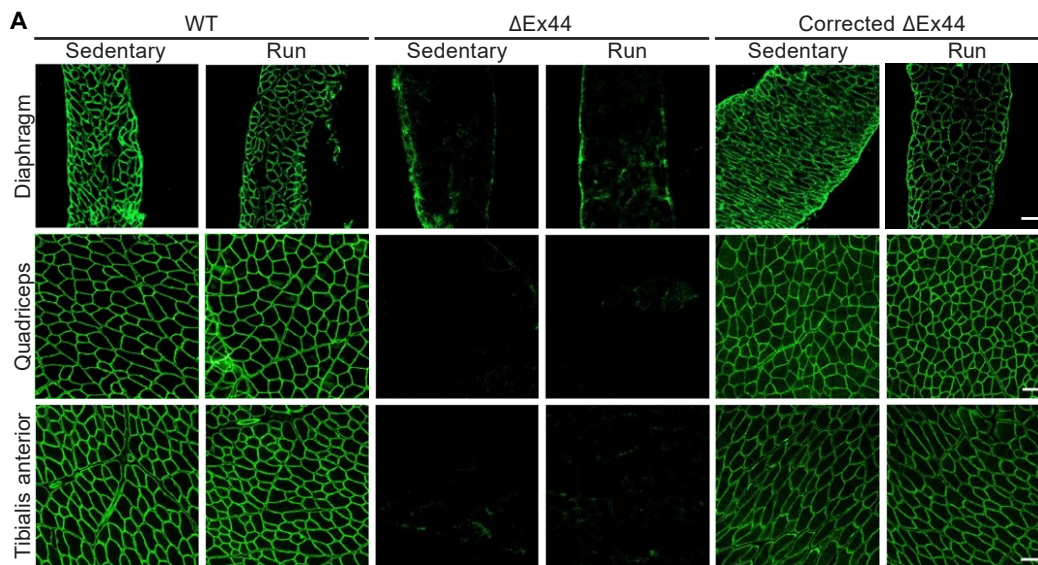
After CRISPR/Cas9-mediated "single-cut" genome editing, skeletal muscles of DEx44 mice were protected from damage. Under sedentary conditions, corrected DEx44 muscle contained <5% centralized nuclei and <1% necrosis (Figures 1B–1D and S2). After downhill running, there was no significant increase in centralized nuclei or necrosis in corrected DEx44 skeletal muscle (Figures 1B–1D and S2). In addition, following downhill running, the serum CK activity of corrected DEx44 mice was 10% of uncorrected DEx44 mice (Figure S3). Because serum CK activity is a marker for muscle fiber integrity, these results demonstrate that corrected DEx44 muscle fibers are resistant to damage induced by downhill running.

To assess corrected DEx44 skeletal muscle function following chronic injury, we performed hindlimb grip strength tests and *ex vivo* electrophysiological analyses of the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles. Following downhill running, we observed a 40% reduction in the grip strength of DEx44 mice relative to WT mice (Figure 1E). However, the grip strengths of corrected DEx44 and WT mice were indistinguishable after downhill running (Figure 1E). Consistent with these results, following downhill running, the maximum specific forces of DEx44 EDL and soleus muscles were 65% of the forces generated by WT muscles (Figure 1F). In contrast, the maximum specific forces of corrected DEx44 EDL and soleus



**Figure 1. CRISPR/Cas9 genome editing prevents skeletal muscle injury induced by downhill running in DEx44 mice**

(A) DEx44 mice were injected intraperitoneally (IP) with ssAAV-SpCas9 and scAAV-sgRNA, each at  $8 \times 10^{13}$  vg/kg on postnatal day 4 (P4) (corrected DEx44). At 4 weeks of age, mice were subjected to sedentary or downhill running conditions for 4 weeks. (B) H&E staining of the quadriceps muscle from WT, DEx44, and corrected DEx44 mice that were either sedentary or run downhill. Scale bar, 100  $\mu$ m. (C) Quantification of centralized nuclei in sedentary or downhill run WT, DEx44, and corrected DEx44 quadriceps muscle. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t test was performed. \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 6$ ). (D) Quantification of necrotic area in sedentary or downhill run WT, DEx44, and corrected DEx44 quadriceps muscle. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t test was performed. \*\*\*\* $p < 0.0001$  ( $n = 6$ ). (E) Hindlimb grip strengths of WT, DEx44, and corrected DEx44 mice, measured following 4 weeks of downhill running. Hindlimb grip strength was normalized to body weight. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. A one-way ANOVA and a *post hoc* Tukey's multiple comparison test were performed. \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 5$ ). (F) Specific force generated by the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles of WT, DEx44, and corrected DEx44 mice following 4 weeks of downhill running. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. A one-way ANOVA and a *post hoc* Tukey's multiple comparison test were performed. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  ( $n = 5$ ).



(legend on next page)

muscles were equivalent to the WT controls (Figure 1F). Together, these results demonstrate that CRISPR/Cas9 gene editing provides functional benefit to DEx44 muscle subjected to chronic injury.

IHC for dystrophin revealed the lack of dystrophin-positive fibers in sedentary and downhill run DEx44 skeletal muscle (Figure 2A). In contrast, >75% of muscle fibers expressed dystrophin in the diaphragm, TA, quadriceps, EDL, and soleus muscles of sedentary and downhill-run corrected DEx44 mice (Figures 2A, S4, S5A, and S5B). Western blot analysis indicated the absence of dystrophin expression in sedentary and downhill run DEx44 mice (Figures 2B, 2C, S5C, and S5D). In sedentary corrected DEx44 mice, there was >30% rescue of dystrophin protein across various muscle groups relative to WT (Figures 2B, 2C, S5C, and S5D). After downhill running, gene edited dystrophin protein levels remained constant in corrected DEx44 mice (Figures 2B, 2C, S5C, and S5D). Consistent with these findings, we observed no decrease in on-target INDELS or AAV9-SpCas9 viral genomes in the quadriceps muscles of corrected DEx44 mice following downhill running (Figures S6 and S7). Thus, CRISPR/Cas9-mediated gene editing in DEx44 mice restores dystrophin expression, prevents muscle damage, and provides functional benefit following chronic injury.

#### CRISPR/Cas9 gene editing normalizes the transcriptome of corrected DEx44 skeletal muscle

The DGC preserves muscle fiber integrity and participates in mechanical signal transduction.<sup>3,6</sup> Previous work demonstrated that CRISPR/Cas9 correction of dystrophin mutations restores the DGC to the sarcolemma.<sup>4,5,28,29</sup> However, in corrected DMD skeletal muscle, it is unknown whether gene expression pathways downstream of the DGC are properly restored. Therefore, we compared gene expression profiles of quadriceps muscles from WT, DEx44, and corrected DEx44 mice by RNA sequencing (RNA-seq) analysis.

In quadriceps muscles from 4-week-old DEx44 mice, we identified 1,222 upregulated and 216 downregulated genes (>2-fold difference, adjusted  $p < 0.01$ ) compared with WT muscle (Figure 3A). Gene ontology (GO) analysis revealed that the upregulated genes were enriched in terms such as innate immune response, chemotaxis, cellular response to interferon gamma, and the adaptive immune response (Figure S8A). In DMD, membrane damage elicits uptake of cellular debris by the innate immune system, and subsequent cytokine release activates the adaptive immune response.<sup>30</sup> Meanwhile, GO analysis of the downregulated genes revealed terms related to cell junctions, Z disc, I band, and skeletal muscle thin filament assembly, consistent with the degeneration of DMD skeletal muscle (Figure S8A).

To determine the effects of gene editing, we compared the transcriptomes of WT, DEx44, and corrected DEx44 quadriceps muscles (Figure 3A). Compared with DEx44 muscle, there were 187 upregulated and 1,142 downregulated genes (>2-fold difference, adjusted  $p < 0.01$ ) in corrected DEx44 quadriceps muscle. Upregulated genes were related to myofibril, muscle myosin complex, and integral components of the membrane (Figure 3B). Downregulated genes were related to T cell activation, regulation of cytokine production, tumor necrosis factor superfamily cytokine production, and regulation of phagocytosis (Figure 3B). Therefore, CRISPR/Cas9 genome editing of the DEx44 mutation normalizes the DMD phenotype at the transcriptomic level.

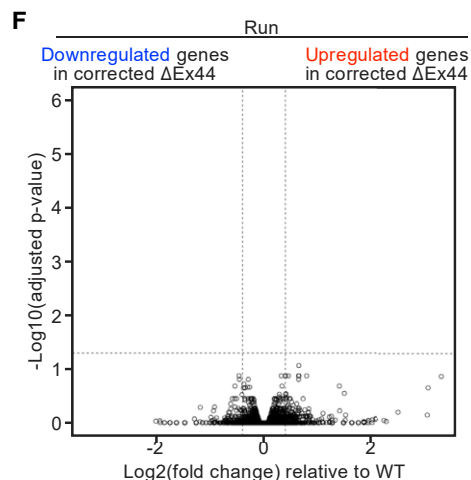
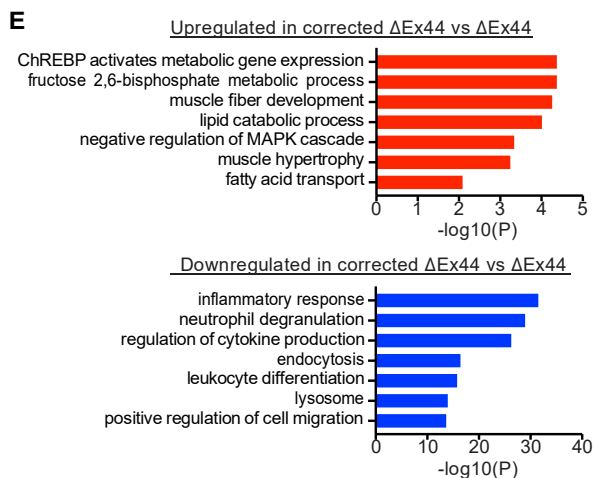
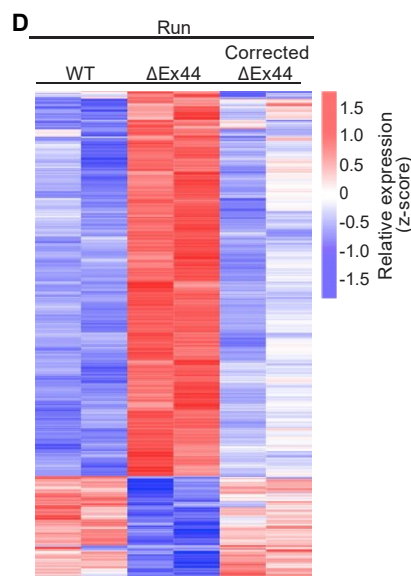
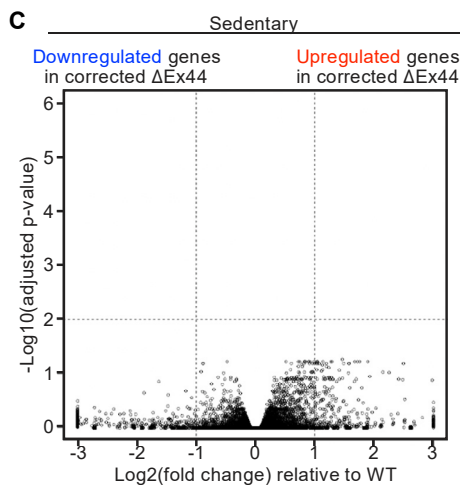
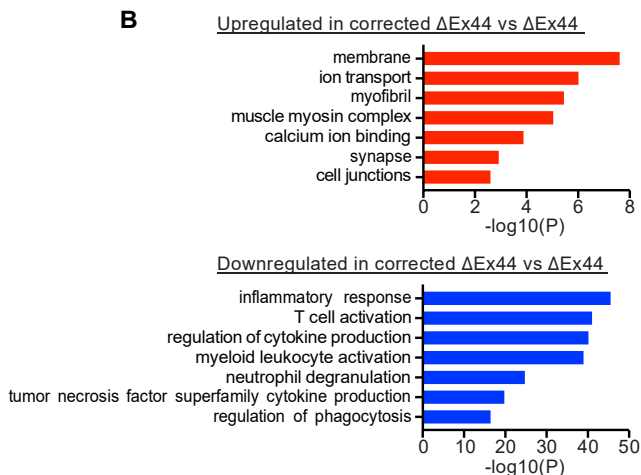
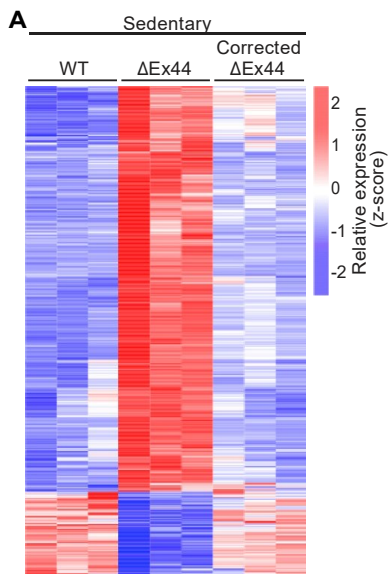
Differential gene expression analysis of the transcriptomes of WT and corrected DEx44 quadriceps muscles revealed no significant differentially expressed genes between the two groups (Figure 3C). Consistent with these findings, principal-component analysis (PCA) revealed high divergence between the transcriptomes of WT and DEx44 quadriceps muscles (Figure S8B), whereas the transcriptomes of WT and corrected DEx44 quadriceps muscles were highly similar (Figure S8B).

Next, we sought to determine whether the normalization of gene expression of DMD muscle by gene editing was maintained following chronic stress from forced downhill running. Therefore, we conducted RNA-seq analysis of quadriceps muscles from 8-week-old WT, DEx44, and corrected DEx44 mice that had undergone 4 weeks of downhill running (Figure 3D). Differential gene expression analysis revealed 679 upregulated and 149 downregulated genes (>2-fold difference, adjusted  $p < 0.05$ ) in the downhill run DEx44 quadriceps muscles relative to WT (Figure 3D). GO analysis of upregulated genes revealed terms related to immune system processes, phagocytosis, and the external side of the plasma membrane (Figure S8C). Downregulated genes were related to cell junctions, membrane, and neuron projections (Figure S8C). These transcriptional changes are consistent with the increased muscle damage and necrosis observed in the downhill run DEx44 quadriceps muscles.

Comparison of the transcriptomes of the downhill run DEx44 and corrected DEx44 quadriceps muscles revealed 510 dysregulated genes between the two groups (>2-fold difference, adjusted  $p < 0.05$ ) (Figure 3D). GO analysis of the downregulated genes in corrected DEx44 quadriceps muscles revealed terms related to inflammatory response, lysosome, and extracellular matrix deposition (Figure 3E). These downregulated genes indicated that CRISPR/Cas9 genome editing preserved muscle fiber integrity following

Figure 2. Expression of dystrophin is retained in corrected DEx44 mice following chronic injury

(A) Immunohistochemistry shows retention of dystrophin-positive fibers in the diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles of corrected DEx44 mice following 4 weeks of downhill running. Dystrophin is shown in green. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Western blot analysis shows retention of dystrophin protein in the diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles of corrected DEx44 mice following 4 weeks of downhill running. Vinculin was loading control. (C) Quantification of dystrophin protein in diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles. Dystrophin protein levels were first normalized to vinculin loading control and then to WT sedentary controls. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's *t* test was performed ( $n = 3$ ).



(legend on next page)

downhill running. These results are consistent with histology and muscle function findings (Figures 1 and S2). Interestingly, GO analysis of the upregulated genes in corrected DEx44 quadriceps muscles revealed terms related to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, glucose and lipid metabolism, and muscle fiber development (Figure 3E). In normal muscle, running has been shown to activate MAPK and downstream signaling to promote fat and glucose utilization to meet increased metabolic demands.<sup>31,32</sup> In DMD muscle, repeated damage to the sarcolemma does not allow muscle fibers to properly adapt to running.<sup>33</sup> Therefore, our results suggest that gene edited dystrophin expression is sufficient to preserve muscle fiber integrity and to permit proper adaptations to downhill running.

Finally, to assess the degree of transcriptional rescue in downhill-run corrected DEx44 mice, we compared differentially expressed genes between WT and corrected DEx44 quadriceps muscles following downhill running. Differential gene expression analysis revealed no significant differentially expressed genes between the two groups (Figure 3F). To validate these findings, we conducted PCA of downhill run WT, DEx44, and corrected DEx44 quadriceps muscles (Figure S8D). While DEx44 and corrected DEx44 quadriceps muscles were highly divergent, WT and corrected DEx44 quadriceps muscles clustered closely (Figure S8D). Therefore, our RNA-seq results indicate that CRISPR/Cas9 genome editing of the DEx44 mutation rescues the transcriptome of DMD muscle, and that transcriptional homeostasis is preserved following chronic injury caused by downhill running.

#### Destruction of myofibers results in the loss of gene edited dystrophin expression

Recently, it was reported that AAV9 can transduce satellite cells.<sup>34–36</sup> The muscle-specific CK8e promoter has also been suggested to be active in satellite cells, although there is debate as to the level of activity of this promoter in these cells.<sup>36</sup> Injection of muscle with BaCl<sub>2</sub> results in rapid ablation of muscle fibers and is followed by regeneration via satellite cell activation.<sup>37</sup> To determine whether activated satellite cells were capable of restoring dystrophin expression following myofiber ablation, we injected TA muscles of 3-month-old WT, DEx44, and corrected DEx44 mice with BaCl<sub>2</sub> to induce acute injury (Figure 4A). Two months following BaCl<sub>2</sub> injection, H&E analysis of WT TA muscle showed muscle fibers with centralized nuclei and no necrosis, indicative of robust regeneration (Figure S9). In contrast, corrected DEx44 TA muscle exhibited small necrotic foci similar to those of uncorrected DEx44 TA muscle, suggesting impaired muscle regen-

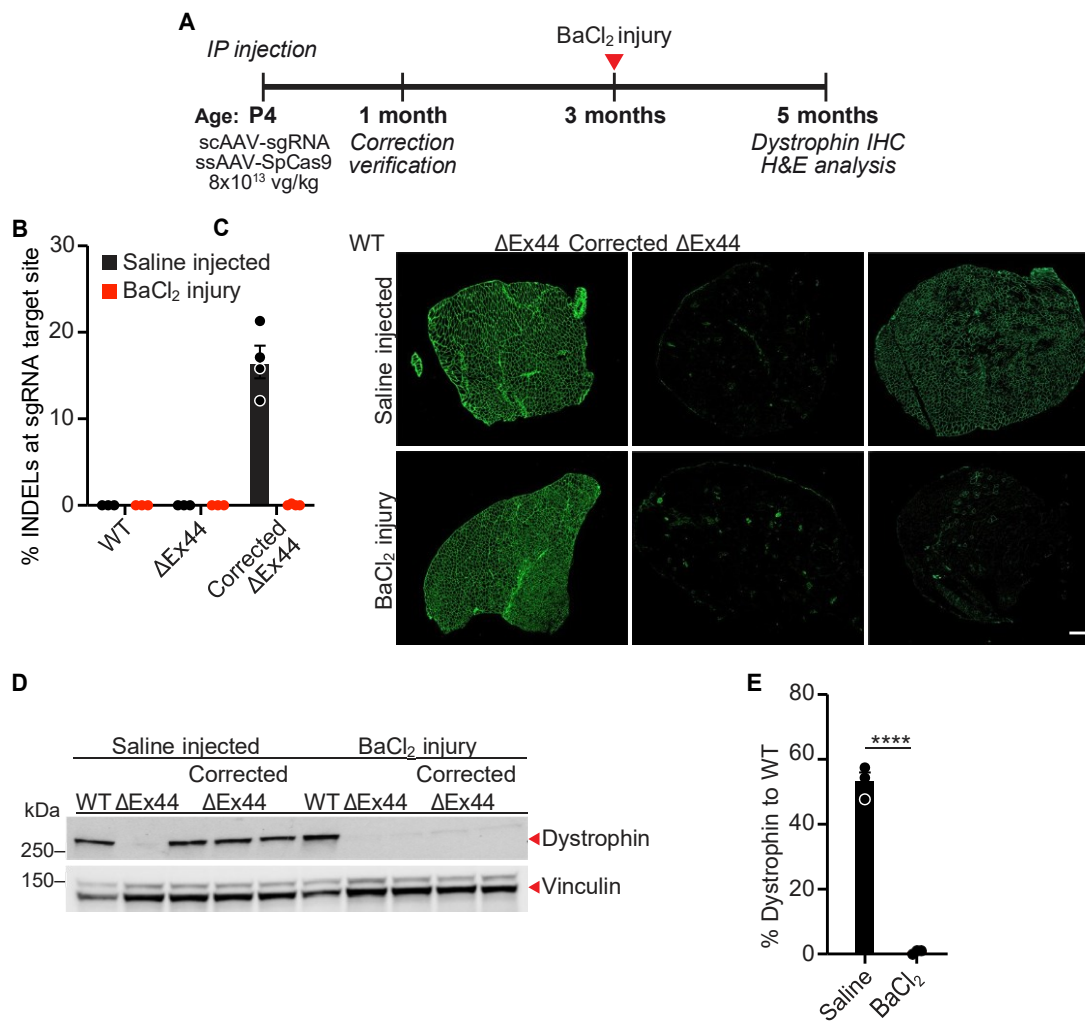
eration (Figure S9). To determine whether this impaired muscle regeneration was due to a loss in gene edited muscle nuclei, we performed genomic analysis of BaCl<sub>2</sub> injected, corrected DEx44 TA muscle and saline injected contralateral controls (Figure 4B). In the saline injected, corrected DEx44 TA muscle, we observed ~20% INDELs within exon 45 (Figure 4B). However, we did not detect INDELs in corrected DEx44 TA muscle injected with BaCl<sub>2</sub>, suggesting a complete loss of CRISPR/Cas9 genome editing (Figure 4B). Consistent with these results, IHC showed a loss of almost all dystrophin-positive fibers in BaCl<sub>2</sub> treated, corrected DEx44 TA muscle when compared with saline injected controls (Figure 4C). Western blot analysis showed <5% of WT dystrophin protein levels in corrected DEx44 TA muscle following acute injury (Figure 4D). In addition, we were unable to detect ssAAV-SpCas9 viral genomes in BaCl<sub>2</sub> treated, corrected DEx44 TA muscle (Figure S10). Together, these results suggest that satellite cells are not efficiently edited by the AAV delivery strategy deployed in these experiments. As a result, following BaCl<sub>2</sub> induced injury, CRISPR/Cas9 gene edited myofiber nuclei were replaced by unedited satellite cells, resulting in the loss of gene edited dystrophin expression.

#### Gene edited dystrophin expression is sustained in 18-month-old corrected DEx44 mice

To determine whether gene edited dystrophin was expressed throughout the lifespan of corrected DEx44 mice, we analyzed 18-month-old corrected DEx44 mice for gene edited dystrophin expression. IHC showed no dystrophin-positive fibers in the DEx44 diaphragm, TA, and quadriceps muscles (Figure 5A). In contrast, >90% of muscle fibers in the corrected DEx44 diaphragm, TA, and quadriceps muscles were dystrophin positive (Figures 5A and S11). Consistent with these findings, western blot analysis did not detect dystrophin in the DEx44 skeletal muscle, whereas there was >40% rescue of dystrophin protein expression in the corrected DEx44 diaphragm, TA, and quadriceps muscles, relative to WT (Figures 5B and 5C).

To determine whether CRISPR/Cas9 genome editing could rescue muscle degeneration seen in 18-month-old DEx44 mice, we performed H&E analysis (Figure 5D). In corrected DEx44 mice, we observed <1% necrosis and <10% centrally nucleated muscle fibers in the diaphragm, TA, and quadriceps muscles (Figures 5D and S12). Together, these findings demonstrate that sustained gene edited dystrophin expression prevents skeletal muscle degeneration in 18-month-old corrected DEx44 mice.

Figure 3. Transcriptional homeostasis is maintained in quadriceps muscle of corrected DEx44 mice following downhill running (A) Heatmap of differentially expressed genes in the quadriceps muscles of 4-week-old WT, DEx44, and corrected DEx44 mice. Gene expression is represented as a transformed Z score (n = 3). (B) Selected GO terms for up- and downregulated genes in corrected DEx44 quadriceps muscle relative to DEx44 quadriceps muscle. (C) Volcano plot of differentially expressed genes between corrected DEx44 and WT quadriceps muscles. (D) Heatmap of differentially expressed genes in the quadriceps of 8-week-old WT, DEx44, and corrected DEx44 mice following 4 weeks of downhill running. Gene expression is represented as a transformed Z score (n = 2). (E) Selected GO terms for up- and downregulated genes in downhill-run-corrected DEx44 quadriceps muscle relative to DEx44 quadriceps muscle. (F) Volcano plot of differentially expressed genes between downhill-run-corrected DEx44 and WT quadriceps muscles.



**Figure 4.** BaCl<sub>2</sub>-induced acute injury results in the loss of gene edited dystrophin (A) DEx44 mice were injected intraperitoneally (IP) with ssAAV-SpCas9 and scAAV-sgRNA, each at  $8 \times 10^{13}$  vg/kg on postnatal day 4 (P4) (corrected DEx44). At 3 months of age, the corrected DEx44 tibialis anterior muscle was injected with BaCl<sub>2</sub>. Two months after BaCl<sub>2</sub> injury, tissues were harvested for analysis. (B) TIDE analysis of *Dmd* exon 45 in saline-injected or BaCl<sub>2</sub> treated WT, DEx44, and corrected DEx44 tibialis anterior muscle. (C) Immunohistochemistry shows the loss of dystrophin-positive fibers in corrected DEx44 tibialis anterior muscle following BaCl<sub>2</sub> injury. Dystrophin is shown in green. Scale bar, 250 μm (n = 4). (D) Western blot analysis shows a loss of dystrophin protein in the tibialis anterior muscle of corrected DEx44 mice following BaCl<sub>2</sub> injury. Vinculin was loading control. (E) Quantification of dystrophin protein in saline or BaCl<sub>2</sub> injected, corrected DEx44 TA muscle. Dystrophin protein levels were first normalized to vinculin loading control and then to corresponding WT controls. Data are shown as mean ± SEM. Unpaired Student's t test was performed. \*\*\*\*p < 0.0001 (n = 3).

#### Analysis of SpCas9 expression and gene editing in aged mice

In addition to sustained dystrophin protein expression, we observed significant SpCas9 protein expression in corrected DEx44 mice at 18 months of age (Figure 4B). To determine the long-term effects of SpCas9 in skeletal muscle, we performed amplicon-based deep sequencing on genomic DNA isolated from 18-month-old corrected DEx44 TA. We observed, on average, 23.5% INDEL formation in exon 45 of the *Dmd* gene (Figure 5E). Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) analysis indicated that there was a 15% increase in the total on-target INDEL formation compared with 4-week-old corrected DEx44 TA (Figure S13). Approximately 80% of these INDELS

were a single-nucleotide insertion or a two-nucleotide deletion at the predicted double-stranded DNA cleavage site, which results in productive reframing of the dystrophin transcript (Figure S14 and Table S1).<sup>17</sup>

Also, using CRISPR design tools (Benchling), we determined the top 10 potential off-target sites, as previously described.<sup>17</sup> We did not observe significant INDELS at these predicted off-target sites (Figure 5E). In addition, we observed <1% AAV genome integration at the target site and none at the potential off-target sites (Table S1). The rates of off-target editing and AAV integration were similar to

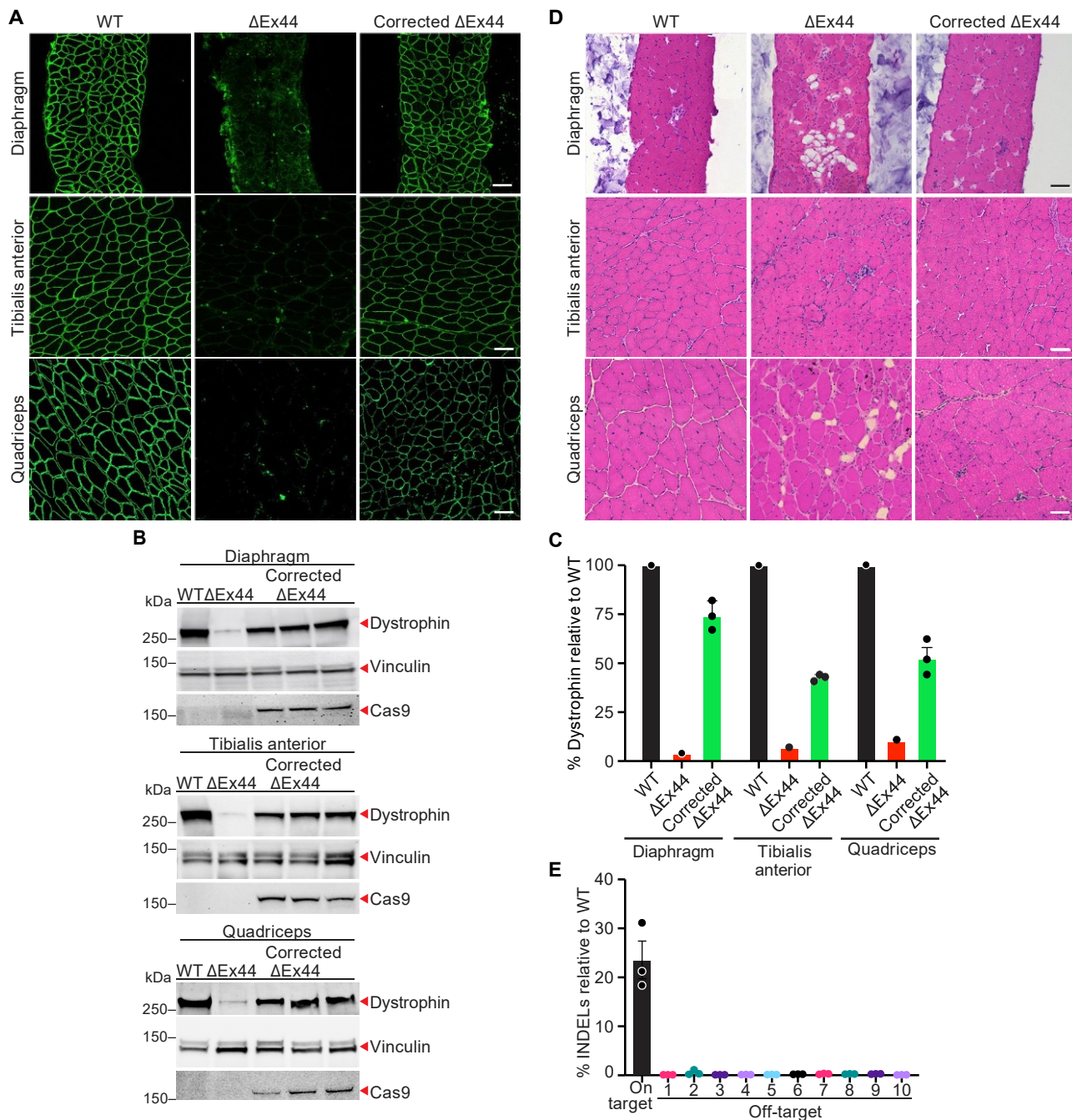


Figure 5. Gene edited dystrophin is retained in 18-month-old corrected DEx44 mice

(A) Immunohistochemistry shows dystrophin-positive muscle fibers in the diaphragm and tibialis anterior of 18-month-old corrected DEx44 mice. Dystrophin is shown in green. Scale bar, 100 μm. (B) Western blot analysis shows sustained dystrophin and SpCas9 expression in the diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles of 18-month-old corrected DEx44 mice. Vinculin was loading control. (C) Quantification of dystrophin protein in the diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles. Dystrophin protein levels were first normalized to vinculin loading control and then to WT controls. Data are shown as mean ± SEM. (D) H&E staining of the diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles from 18-month-old WT, DEx44, and corrected DEx44 mice. Scale bar, 100 μm. (E) INDEL analysis of the on-target and top 10 off-target sites in 18-month-old corrected DEx44 tibialis anterior muscle. INDELS have been normalized to a WT control (n = 3).



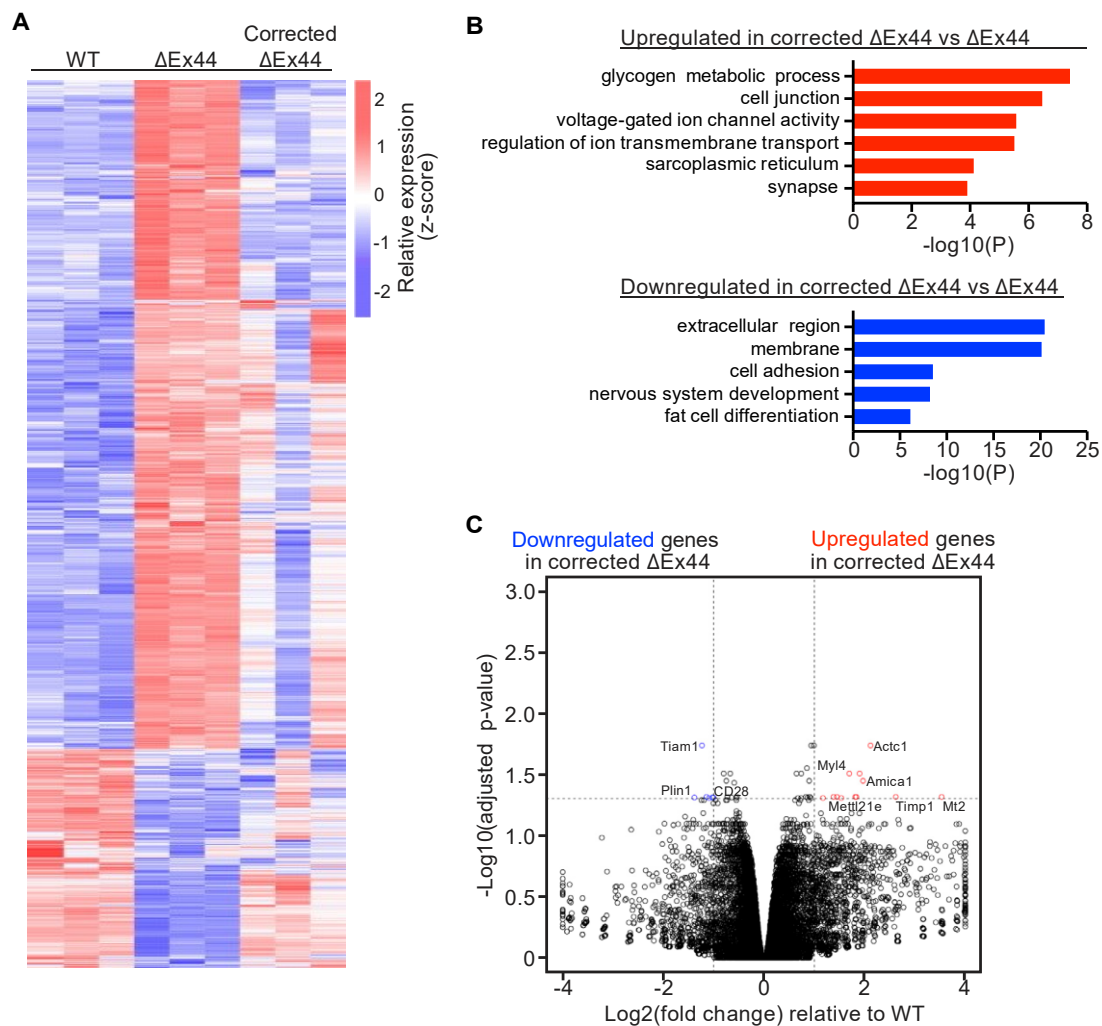


Figure 6. Transcriptional homeostasis is maintained in 18-month-old corrected DEx44 quadriceps muscle (A) Heatmap of differentially expressed genes in 18-month-old WT, DEx44, and corrected DEx44 quadriceps muscles. Gene expression is represented as a transformed Z score (n = 3). (B) Selected GO terms for up- and downregulated genes in 18-month-old corrected DEx44 quadriceps muscle relative to DEx44 quadriceps muscle. (C) Volcano plot of differentially expressed genes between 18-month-old corrected DEx44 and WT quadriceps muscles.

those previously reported in 4-week-old corrected DEx44 TA, suggesting that sustained expression of SpCas9 does not result in significant off-target editing.<sup>17</sup>

#### Transcriptional homeostasis is retained in 18-month-old corrected DEx44 skeletal muscle

To determine the longevity of CRISPR/Cas9-mediated transcriptional homeostasis, we performed RNA-seq of quadriceps muscles from 18-month-old mice (Figure 6A). In DEx44 quadriceps muscle, there were 1,571 upregulated and 524 downregulated genes when compared with WT (>2-fold change,  $p < 0.01$ ). GO analysis of upregulated genes revealed terms related to immune system processes, positive regulation of tumor necrosis factor, and signal transduction (Figure S15A). Downregulated genes were related to membrane,

ion channel activity, and muscle contraction (Figure S15A). These findings are consistent with the severe muscle degeneration observed in 18-month-old DEx44 skeletal muscle.

Next, we compared the transcriptomes of 18-month-old corrected DEx44 and DEx44 quadriceps muscles. Compared with DEx44 quadriceps muscles, there were 193 upregulated and 526 downregulated genes in corrected DEx44 quadriceps muscles (>2-fold change,  $p < 0.01$ ). GO analysis of upregulated genes revealed terms related to glycogen metabolic processes, cell junctions, ion channel activity, sarcoplasmic reticulum, and synapses (Figure 6B). Downregulated genes were related to the extracellular region, cell adhesion, and fat cell differentiation (Figure 6B). These findings suggest that corrected DEx44 muscle fibers are largely intact and are not replaced by

adipose tissue and fibrosis, which is also observed histologically (Figure 5D).

To evaluate the extent of this transcriptional rescue, we compared the transcriptomes of 18-month-old corrected DEx44 and WT quadriceps muscles. Only 18 genes were dysregulated in corrected DEx44 quadriceps muscles compared with WT (>2-fold change,  $p < 0.05$ ). Upregulated genes were related to immune system processes (*Timp1*, *Lcn2*, *Mt2*, *Ccl6*, and *Nox4*) and to regenerating muscle fibers (*Myh3*, *Myl4*, and *Actc1*) (Figure 6C). Downregulated genes were involved in energy utilization (*Plin1* and *Tiam1*) (Figure 6C). Additionally, we observed a downregulation in *Cd28*, which is also observed in chronic inflammation (Figure 6C).<sup>38</sup> These results indicate activation of the immune system in response to muscle fiber damage. However, considering the small number of dysregulated genes, the inflammation in 18-month-old corrected DEx44 quadriceps muscle is very mild. Consistent with this conclusion, there was only a small distance between corrected DEx44 and WT samples in a PCA plot (Figure S15B), suggesting that the transcriptional rescue observed in corrected DEx44 skeletal muscle persists with aging.

## DISCUSSION

Multiple studies have utilized CRISPR/Cas9 gene editing to rescue dystrophin expression in mouse models of DMD (reviewed in Chermello et al<sup>13</sup>; Coi and Koo<sup>14</sup>; and Olson<sup>15</sup>). However, the durability of gene edited DMD skeletal muscle following chronic injury has not been fully explored. Because mice lacking dystrophin maintain mobility and display a relatively modest phenotype,<sup>39</sup> we used high-speed downhill treadmill running to exacerbate the DMD skeletal muscle phenotype. Here, we demonstrate that CRISPR/Cas9 gene edited DEx44 skeletal muscle is resistant to damage induced by downhill running. Expression of gene edited dystrophin protein was also maintained following chronic injury.

Previous work showed that restoration of ~15% of dystrophin protein is sufficient to maintain muscle fiber integrity in mdx mice.<sup>40,41</sup> In corrected DEx44 skeletal muscle, we observed rescue of dystrophin expression to >30% of normal levels in almost all muscle groups. Thus, there was sufficient dystrophin to stabilize the sarcolemma of corrected DEx44 muscle fibers. We and others have reported that CRISPR/Cas9 gene editing can restore the DGC at the sarcolemma.<sup>4,5,17,28,29</sup> In the present study, corrected DEx44 and WT skeletal muscle transcriptomes were indistinguishable after chronic injury. Therefore, we hypothesize that mechanical signal transduction downstream of the DGC was restored in corrected DEx44 skeletal muscle, allowing adaptation to the eccentric contractions induced by chronic injury. Together, these results suggest that CRISPR/Cas9 genome editing can preserve muscle fiber integrity. Thus, the durability of gene edited DMD muscle demonstrates the promise of CRISPR/Cas9 genome editing as a potential therapeutic for DMD.

Remarkably, we observed >40% restoration of dystrophin protein after 18 months, demonstrating the stability of gene edited myofibers.

Our *in vivo* CRISPR/Cas9 strategy utilizes the muscle-specific CK8e promoter to drive SpCas9 expression. The CK8e promoter is not highly active in the resident muscle stem cells.<sup>36</sup> Therefore, we would expect a decrease in dystrophin expression with aging due to the fusion of unedited resident stem cells with corrected DMD muscle fibers. However, we observed an increase in on-target INDEL formation with age. Also, we observed significant SpCas9 expression at 18 months. It is possible that sustained SpCas9 expression resulted in editing of newly incorporated muscle nuclei.

The sustained expression of SpCas9 at 18 months raises a potential concern of increased off-target genome editing over time. Importantly, however, we observed <1% off-target genome editing in 18-month-old corrected DEx44 TA muscle. In addition, there was <1% of AAV integration at the target locus and no observable AAV integration at the top 10 predicted off-target sites. These low off-target editing rates, combined with the postmitotic nature of skeletal muscle, diminish the likelihood of malignant transformations resulting from long-term systemic gene editing.

Our results add to a growing body of work suggesting that CRISPR/Cas9 gene editing may confer long-term benefits in DMD.<sup>22,23</sup> The clinical efficacy and safety of AAV9 were demonstrated in successful SMA gene-therapy trials.<sup>42</sup> However, AAV can only be effectively delivered once due to the development of a humoral immune response.<sup>43</sup> Importantly, our findings suggest that a single CRISPR AAV dose is sufficient to maintain long-term gene edited dystrophin expression. It will be of interest to monitor gene edited dystrophin expression over longer times in larger mammalian DMD models in which the progression of muscle fiber degeneration is much more severe than in mice.

In this study, we showed that CRISPR/Cas9 genome editing protected DEx44 skeletal muscle from chronic injury caused by downhill running. However, acute injury induced by BaCl<sub>2</sub> resulted in the loss of gene edited dystrophin. Recent studies have shown that AAV9 can transduce satellite cells, albeit relatively inefficiently.<sup>35,36</sup> However, the CK8e promoter shows low activity in satellite cells.<sup>36</sup> We hypothesize that low promoter activity, combined with relatively low tropism of AAV9 for satellite cells, resulted in inefficient satellite cell genome editing in corrected DEx44 mice. Therefore, following BaCl<sub>2</sub> injury, muscle was likely reconstituted by unedited satellite cells; hence, we observed little or no dystrophin expression in this setting. In the future, it will be of interest to design a promoter that is highly active in skeletal muscle and satellite cells. Ubiquitously expressed promoters such as CMV are not desirable due to accumulation of Cas9 and editing of non-target tissues.

While acute injury resulted in the loss of gene edited dystrophin, these findings do not diminish the potential of CRISPR/Cas9 genome editing as a long-term therapeutic for DMD. Injury induced by BaCl<sub>2</sub> is more acute and severe than in DMD. Under physiologically relevant stress, as in our chronic injury model and in aging, corrected muscle nuclei are retained and gene edited dystrophin is sustained.

Finally, we recently developed a base editing strategy to induce exon skipping in DMD by disrupting exon splice sites.<sup>44</sup> In addition, new genome editing technologies, such as prime editing, have been developed.<sup>44,45</sup> In the future, it will be of interest to determine the durability of gene edited dystrophin resulting from these new strategies.

## MATERIALS AND METHODS

### Study

### design

This study aimed to determine the durability and longevity of "single-cut" CRISPR/Cas9 gene editing in a mouse model of DMD. Exclusion, randomization, or blinding was not used to assign mice to experiments. Animal work described in this manuscript has been approved and conducted under the oversight of the UT Southwestern Institutional Animal Care and Use Committee. Sample sizes for each experiment are stated in the figure legends and represent independent biological replicates.

### AAV9 production

Single-stranded (ss) and self-complementary (sc) AAV9 were produced and purified by Boston Children's Hospital Viral Core, as previously described.<sup>19</sup> These AAV9 vectors expressed CRISPR/Cas9 genome editing components that target the DEx44 mutation in the *Dmd* gene. AAV9 titers were determined with qPCR, as previously described.<sup>17</sup>

### *In vivo* delivery of CRISPR AAV9 to DEx44 mice

On P4, DEx44 male pups were injected intraperitoneally with 80  $\mu$ L of a viral mixture containing AAV-SpCas9 and AAV-sgRNA, as previously described.<sup>17,19</sup> For long-term studies, viruses were delivered at doses of  $5 \times 10^{13}$  vg/kg for ssAAV-SpCas9 and  $2.5 \times 10^{14}$  vg/kg for ssAAV-sgRNA. While these longevity studies were in progress, our group discovered that packaging the sgRNA expression cassette in scAAV increases sgRNA expression and subsequently enhances gene editing efficiency.<sup>19</sup> Therefore, for injury studies and transcriptome analyses in younger mice, viruses were delivered at doses of  $8 \times 10^{13}$  vg/kg for ssAAV-SpCas9 and  $8 \times 10^{13}$  vg/kg for scAAV-sgRNA. At various time points following systemic AAV9 delivery, mice were sacrificed for physiology, histology, and molecular analysis.

### Downhill

### running

Prior to the forced running regime, WT, DEx44, and corrected DEx44 mice were acclimatized to the treadmill (C Exer-3/6M, Columbus Instruments), as previously described.<sup>24</sup> Then, 4-week-old mice were run (12 m/min at a 25° decline) on alternating days for 1 month. The duration of each running session was 30 min.

### Histological analysis of skeletal muscle

Skeletal muscle was cryosectioned into 8 mm sections, and IHC or H&E staining was conducted, as previously described.<sup>17</sup> For IHC, mouse anti-dystrophin antibody (1:1000, MANDYS8, Sigma-Aldrich, D8168) and Mouse on Mouse biotinylated anti-mouse IgG (BMK-2202, Vector Laboratories) were used.

### Western blot for dystrophin and SpCas9

Skeletal muscle was crushed and lysed in 10% SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.8), 1 mM EDTA, and protease inhibitor. Protein, 50  $\mu$ m, was loaded onto a 4%–20% Criterion TGX Stain-Free Protein Gel. SDS-PAGE electrophoresis, membrane transfer, and membrane blotting were conducted as previously described.<sup>17</sup> Antibodies used for western blot analysis were mouse anti-dystrophin antibody (1:1000, MANDYS8, Sigma-Aldrich, D8168), mouse anti-SpCas9 Antibody (1:1000, clone 7A9, Millipore, MAC133), and mouse anti-vinculin antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, V9131). Secondary antibody was goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) antibody (1:10,000, BioRad).

### Muscle physiology

Following 4 weeks of downhill running, the EDL and soleus muscles were isolated from WT, DEx44, or corrected DEx44 mice, as previously described.<sup>17</sup> Contraction-induced specific force (mN/mm<sup>2</sup>) was measured as previously described.<sup>17</sup>

### Serum creatine measurement

Blood was collected via the submandibular vein and then centrifuged at  $15,000 \times g$  at 4°C to collect the serum. CK activity was measured using VITROS Chemistry 7 slides, as per manufacturer instructions.

### Grip

### strength

### measurements

In a blinded study, grip strengths of WT, DEx44, and corrected DEx44 mice were measured using a grip strength meter (Columbus Instruments), as previously described.<sup>18</sup>

### BaCl<sub>2</sub>

### induced

### injury

Mice were anesthetized with 5% Avertin. The right TA muscle was injected with 50  $\mu$ L of 1.2% (w/v) BaCl<sub>2</sub> in saline. As an uninjured control, in the same mouse, the left TA muscle was injected with 50  $\mu$ L of saline. Two months following injury, the TA muscles were harvested and analyzed for genome editing, dystrophin, and histology.

### Viral genome quantification in skeletal muscle

AAV-SpCas9 viral copy numbers were quantified with qPCR, as previously described.<sup>19</sup> Primers used for qPCR annealed to the SpCas9 gene and are listed in [Table S2](#).

### RNA sequencing

Cryopreserved quadriceps muscle was homogenized in TRIzol (Thermo Fisher Scientific). RNA was isolated using QIAGEN RNeasy columns, as per manufacturer instructions. mRNA library preparation was conducted using a KAPA mRNA HyperPrep Kit (Roche). Deep sequencing and analysis were performed as previously described.<sup>46</sup>

### TIDE analysis

PCR was conducted to amplify a 500 bp region around the target site in exon 45 of the *Dmd* gene. PCR primers are listed in [Table S2](#). Then, Sanger sequencing was conducted. INDELS were analyzed using the

TIDE package (<https://www.tide.deskgen.com>), as previously described.<sup>17,19</sup>

#### Amplicon deep sequencing analysis of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from skeletal muscle using a DNeasy and Blood & Tissue Kit (QIAGEN). PCR was conducted to amplify genomic regions containing the CRISPR/Cas9 target site and predicted off-target sites, as previously described.<sup>17</sup> A second round of PCR was performed to add Illumina flow cell binding sequences and barcodes. Primers are listed in [Table S3](#). Deep sequencing and analysis were conducted as previously described.<sup>17</sup>

#### Data availability

Data to evaluate the conclusions in this paper are presented in the paper figures and [supplemental data](#). RNA-seq data have been uploaded to GEO. GEO profile:GSE180771. Additional data pertaining to this paper can be requested from the authors.

#### Statistics

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. To compare two groups, an unpaired Student's t test was performed. To compare multiple groups, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests were performed;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.03.004>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Mireault for tissue harvesting and performing the grip strength assay; E. Sanchez-Ortiz for performing IHC; H. Li for TIDE analysis and protocols for amplicon-based deep sequencing; X. Menédez Caravia for help with the BaCl<sub>2</sub> study; J. Cabrera for graphics; the Boston Children's Hospital Viral Core for AAV production; the Metabolic Phenotyping Core for serum CK analysis; the Sanger Sequencing Core for sequencing services; and the Histology Core for H&E staining. We are grateful to S. Hauschka (University of Washington) for providing the muscle-specific CK8e promoter, to D. Grimm (Heidelberg University Hospital, Germany) for providing TRISPR-sgRNA expression plasmid, and S. Gray (University of Texas Southwestern Medical Center) for providing the self-complementary AAV plasmid. This work was supported by the National Institutes of Health (NIH) (grants HL130253), Senator Paul D. Wellstone Muscular Dystrophy Specialized Research Center (grant P50 HD 087351), and Robert A. Welch Foundation (grant 1-0025 to E.N.O.).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.R.K., N.L., R.B.-D., and E.N.O. wrote and edited the manuscript. D.R.K., Y.Z, R.B.-D., and E.N.O. designed the experiments. D.R.K. performed downhill running studies and BaCl<sub>2</sub> injury and analyzed data. D.R.K. and F.C. performed the older mouse study and analyzed data. Y.-L.M. generated the mouse model. Y.-L.M. and Y.Z. designed the genome editing strategy. J.H. performed the electrophysiology

studies. P.P.A.M. provided oversight of the electrophysiology analysis. J.K. performed bioinformatic analysis. L.X. provided oversight of the bioinformatic analysis.

#### DECLARATION OF INTERESTS

E.N.O. is a consultant for Vertex Therapeutics. Y.-L.M. is an employee at Vertex Pharmaceuticals. The other authors declare that they have no competing interests.

#### REFERENCES

- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Fairclough, R.J., Wood, M.J., and Davies, K.E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat. Rev. Genet.* 14, 373–378.
- Allen, D.G., Whitehead, N.P., and Froehner, S.C. (2016). Absence of Dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca<sup>2+</sup>, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiol. Rev.* 96, 253–305.
- Amoasii, L., Long, C., Li, H., Mireault, A.A., Shelton, J.M., Sanchez-Ortiz, E., McAnally, J.R., Bhattacharyya, S., Schmidt, F., Grimm, D., et al. (2017). Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 9, eaan8081.
- Amoasii, L., Hildyard, J.C.W., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., Harron, R., Stathopoulou, T.R., Massey, C., Shelton, J.M., et al. (2018). Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 362, 86–91.
- Campbell, K.P., and Kahl, S.D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338, 259–262.
- Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Gaver, M.G., and Campbell, K.P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345, 315–319.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.
- Bladen, C.L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M.E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A.J., Chamova, T., et al. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 36, 395–402.
- Chen, C., Ma, H., Zhang, F., Chen, L., Xing, X., Wang, S., Zhang, X., and Luo, Y. (2014). Screening of Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations and investigating its mutational mechanism in Chinese patients. *PLoS One* 9, e108038.
- Tuffery-Giraud, S., Beroud, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.P., Bernard, R., Cossee, M., Boisseau, P., et al. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945.
- Ginjaar, I.B., Kneppers, A.L., v d Meulen, J.D., Anderson, L.V., Bremmer-Bout, M., van Deutekom, J.C., Weegenaar, J., den Dunnen, J.T., and Bakker, E. (2000). Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 793–796.
- Chemello, F., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2020). Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J. Clin. Invest.* 130, 2766–2776.
- Choi, E., and Koo, T. (2021). CRISPR technologies for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 29, 3179–3191.
- Olson, E.N. (2021). Toward the correction of muscular dystrophy by gene editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 118, e2004840117.
- Long, C., Li, H., Tiburecy, M., Rodriguez-Caycedo, C., Kyrychenko, V., Zhou, H., Zhang, Y., Min, Y.-L., Shelton, J.M., Mammen, P.P.A., et al. (2018). Correction of

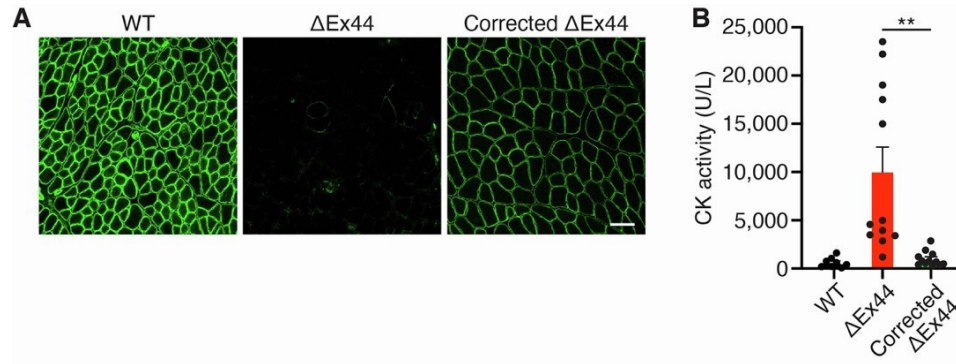
- diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci. Adv.* 4, eaap9004.
17. Min, Y.-L., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Mireault, A.A., Huang, J., Shelton, J.M., McAnally, J.R., Amoasii, L., Mammen, P.P.A., Bassel-Duby, R., et al. (2019). CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci. Adv.* 5, eaav4324.
  18. Long, C., Amoasii, L., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 351, 400–403.
  19. Zhang, Y., Li, H., Min, Y.-L., Sanchez-Ortiz, E., Huang, J., Mireault, A.A., Shelton, J.M., Kim, J., Mammen, P.P.A., Bassel-Duby, R., et al. (2020). Enhanced CRISPR-Cas9 correction of Duchenne muscular dystrophy in mice by a self-complementary AAV delivery system. *Sci. Adv.* 6, eaay6812.
  20. Min, Y.-L., Chemello, F., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Zhang, Y., Bassel-Duby, R., et al. (2020). Correction of three prominent mutations in mouse and human models of Duchenne muscular dystrophy by single-cut genome editing. *Mol. Ther.* 28, 2044–2055.
  21. Dumont, N.A., Bentzinger, C.F., Sincennes, M.C., and Rudnicki, M.A. (2015). Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr. Physiol.* 5, 1027–1059.
  22. Nelson, C.E., Wu, Y., Gemberling, M.P., Oliver, M.L., Waller, M.A., Bohning, J.D., Robinson-Hamm, J.N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R.M., Collier, J.H., et al. (2019). Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 25, 427–432.
  23. Hakim, C.H., Wasala, N.B., Nelson, C.E., Wasala, L.P., Yue, Y., Louderman, J.A., Lessa, T.B., Dai, A., Zhang, K., Jenkins, G.J., et al. (2018). AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCI Insight* 3, e124297.
  24. De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M.P., Frayssé, B., Pierno, S., Burdi, R., Mangieri, D., Rolland, J.F., Camerino, C., et al. (2005). A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine A in dystrophic mdx mice. *Am. J. Pathol.* 166, 477–489.
  25. Brussee, V., Tardif, F., and Tremblay, J.P. (1997). Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul. Disord.* 7, 487–492.
  26. Himeda, C.L., Chen, X., and Hauschka, S.D. (2011). Design and testing of regulatory cassettes for optimal activity in skeletal and cardiac muscles. *Methods Mol. Biol.* 709, 3–19.
  27. Ramos, J.N., Hollinger, K., Bengtsson, N.E., Allen, J.M., Hauschka, S.D., and Chamberlain, J.S. (2019). Development of novel micro-dystrophins with enhanced functionality. *Mol. Ther.* 27, 623–635.
  28. Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Castellanos Rivera, R.M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403–407.
  29. Xu, L., Park, K.H., Zhao, L., Xu, J., El Refaey, M., Gao, Y., Zhu, H., Ma, J., and Han, R. (2016). CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Mol. Ther.* 24, 564–569.
  30. Rosenberg, A.S., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Villalta, S.A., Rao, V.A., Wakefield, L.M., and Woodcock, J. (2015). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 7, 299rv4.
  31. Bengal, E., Aviram, S., and Hayek, T. (2020). p38 MAPK in glucose metabolism of skeletal muscle: beneficial or harmful? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6480.
  32. Kramer, H.F., and Goodyear, L.J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 103, 388–395.
  33. Camerino, G.M., Cannone, M., Giustino, A., Massari, A.M., Capogrosso, R.F., Cozzoli, A., and De Luca, A. (2014). Gene expression in mdx mouse muscle in relation to age and exercise: aberrant mechanical-metabolic coupling and implications for pre-clinical studies in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5720–5732.
  34. Nance, M.E., Shi, R., Hakim, C.H., Wasala, N.B., Yue, Y., Pan, X., Zhang, T., Robinson, C.A., Duan, S.X., Yao, G., et al. (2019). AAV9 edits muscle stem cells in normal and dystrophic adult mice. *Mol. Ther.* 27, 1568–1585.
  35. Goldstein, J.M., Tabeordbar, M., Zhu, K., Wang, L.D., Messemer, K.A., Peacker, B., Ashrafi Kakhki, S., Gonzalez-Celeiro, M., Shwartz, Y., Cheng, J.K.W., et al. (2019). *In situ* modification of tissue stem and progenitor cell genomes. *Cell Rep.* 27, 1254–1264.e7.
  36. Kwon, J.B., ETTYREDDY, A.R., Vankara, A., Bohning, J.D., Devlin, G., Hauschka, S.D., Asokan, A., and Gersbach, C.A. (2020). Gene editing of muscle stem cells with adeno-associated viral vectors in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 19, 320–329.
  37. Morton, A.B., Norton, C.E., Jacobsen, N.L., Fernando, C.A., Cornelison, D.D.W., and Segal, S.S. (2019). Barium chloride injures myofibers through calcium-induced proteolysis with fragmentation of motor nerves and microvessels. *Skelet Muscle* 9, 27.
  38. Bryl, E., Vallejo, A.N., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2001). Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J. Immunol.* 167, 3231–3238.
  39. Yucel, N., Chang, A.C., Day, J.W., Rosenthal, N., and Blau, H.M. (2018). Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *NPJ Regen. Med.* 3, 4.
  40. Godfrey, C., Muses, S., McClorey, G., Wells, K.E., Coursindel, T., Terry, R.L., Betts, C., Hammond, S., O'Donovan, L., Hildyard, J., et al. (2015). How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the mdx mouse. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4225–4237.
  41. van Putten, M., Hulsker, M., Nadarajah, V.D., van Heiningen, S.H., van Huizen, E., van Iterson, M., Admiraal, P., Messemaker, T., den Dunnen, J.T., 't Hoen, P.A., et al. (2012). The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. *PLoS One* 7, e31937.
  42. Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.* 377, 1713–1722.
  43. Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2013). Humoral immune response to AAV. *Front Immunol.* 4, 341.
  44. Chemello, F., Chai, A.C., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Atmanli, A., Mireault, A.A., Liu, N., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2021). Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Sci. Adv.* 7, eabg4910.
  45. 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., et al. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157.
  46. Ramirez-Martinez, A., Zhang, Y., Chen, K., Kim, J., Cenik, B.K., McAnally, J.R., Cai, C., Shelton, J.M., Huang, J., Brennan, A., et al. (2021). The nuclear envelope protein Net39 is essential for muscle nuclear integrity and chromatin organization. *Nat. Commun.* 12, 690.

OMTN, Volume 28

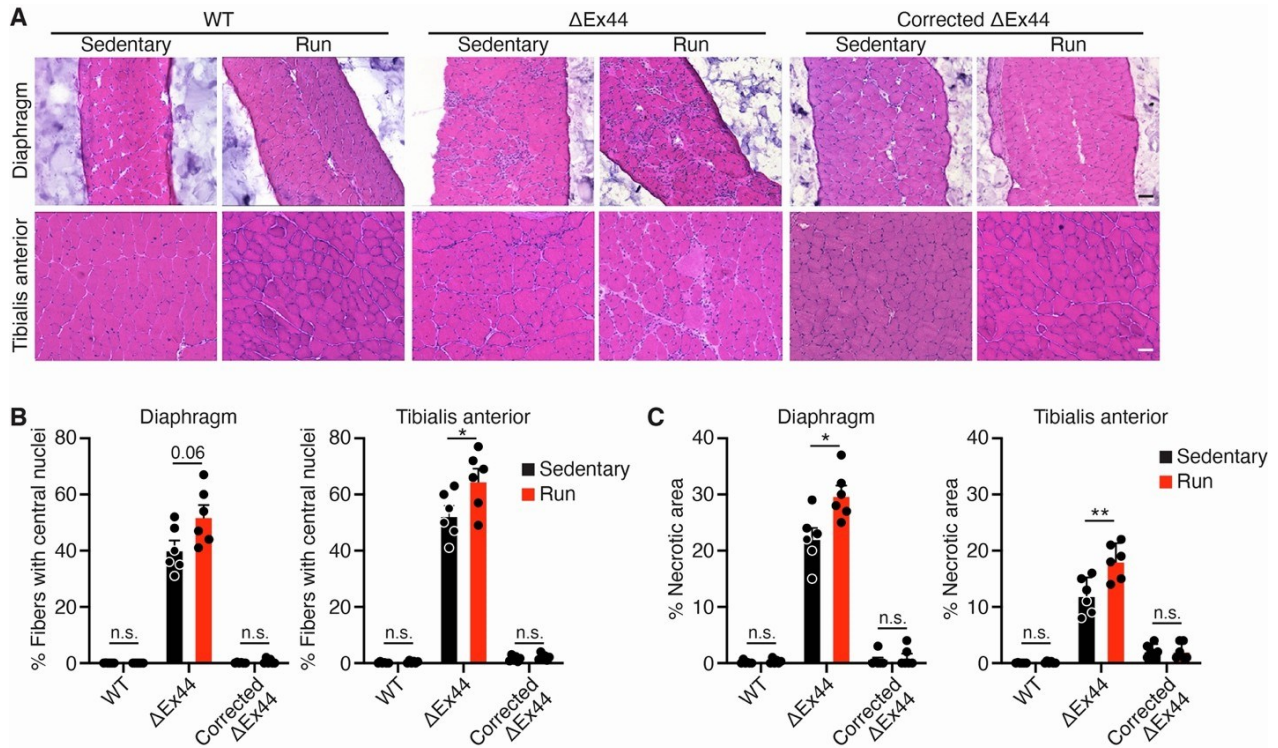
## Supplemental information

### Long-term maintenance of dystrophin expression and resistance to injury of skeletal muscle in gene edited DMD mice

Dileep R. Karri, Yu Zhang, Francesco Chemello, Yi-Li Min, Jian Huang, Jiwoong Kim, Pradeep P.A. Mammen, Lin Xu, Ning Liu, Rhonda Bassel-Duby, and Eric N. Olson



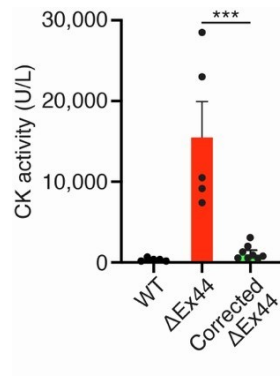
**Figure S1. Verification of correction of  $\Delta$ Ex44 mice.** (A) Immunohistochemistry shows dystrophin restoration in the tibialis anterior muscle of corrected  $\Delta$ Ex44 mice. Dystrophin is shown in green. Scale bar, 100  $\mu$ m ( $n = 3$ ). (B) Serum creatine kinase (CK) activity in 4-week-old WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 mice. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's  $t$ -test was performed. \*\* $P < 0.005$  ( $n \geq 9$ ).



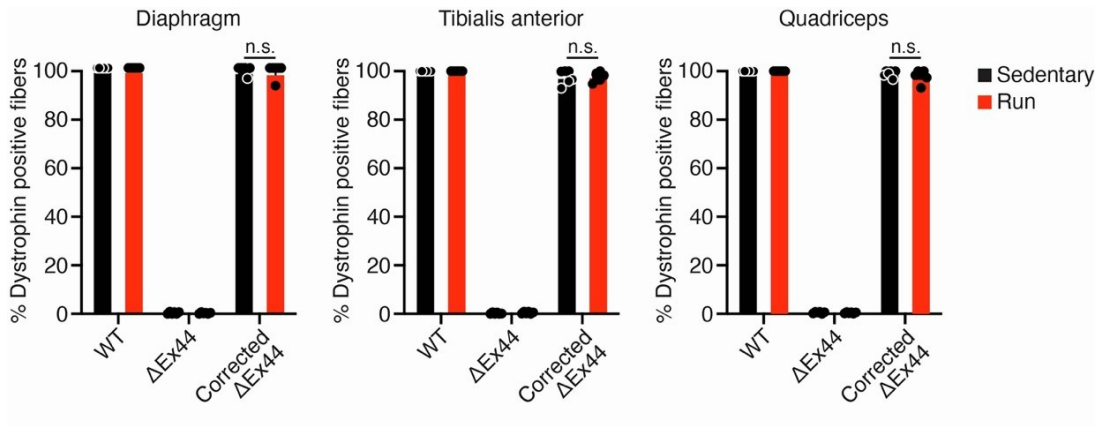
**Figure S2. CRISPR/Cas9 genome editing prevents skeletal muscle injury induced by downhill running in the diaphragm and tibialis anterior muscles of corrected ΔEx44 mice.**

(A) H&E staining of the tibialis anterior and diaphragm muscles from WT, ΔEx44, and corrected ΔEx44 mice that were either sedentary or run downhill for 4 weeks. Scale bar, 100 μm. (B) Quantification of centralized nuclei in diaphragm and tibialis anterior muscles from sedentary or downhill run WT, ΔEx44, and corrected ΔEx44 mice. Data are shown as mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*P<0.05 (n = 6). (C) Quantification of necrotic area in diaphragm and tibialis anterior muscles from sedentary or downhill run WT, ΔEx44, and corrected ΔEx44 mice. Data are shown as mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*P<0.05, \*\*P<0.005 (n = 6).

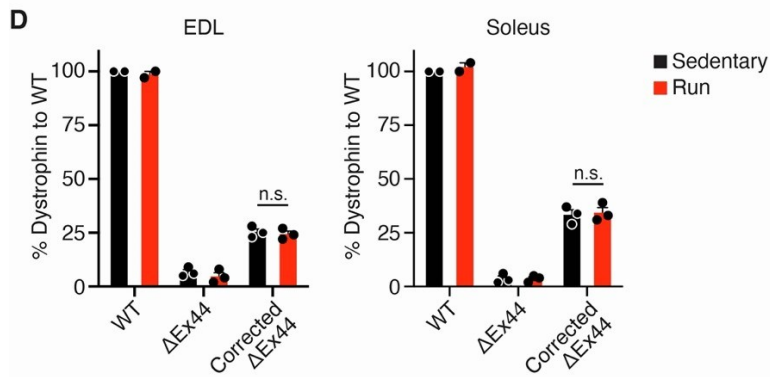
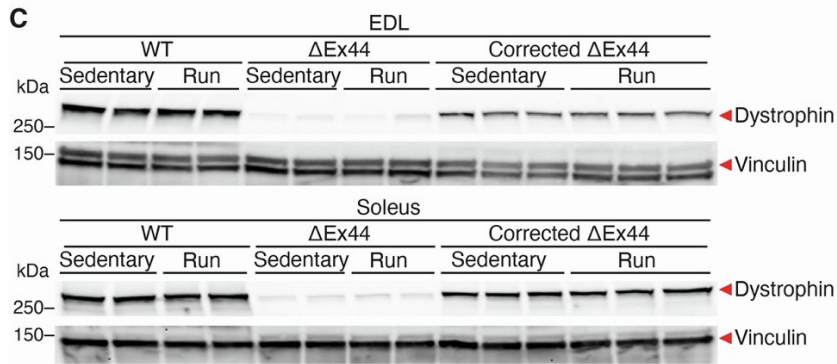
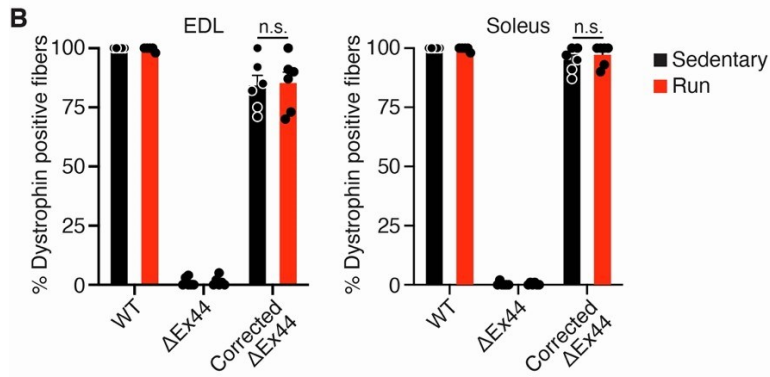
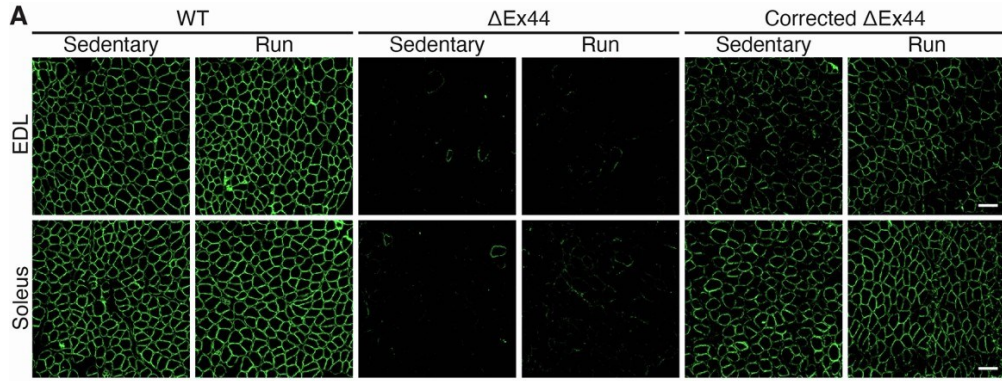




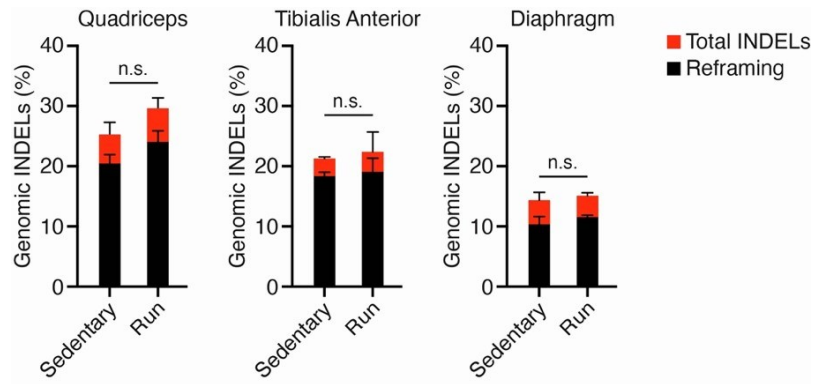
**Figure S3. Serum creatine kinase (CK) activity in WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 mice following 4 weeks of downhill running.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\*\* $P < 0.001$  ( $n \geq 5$ ).



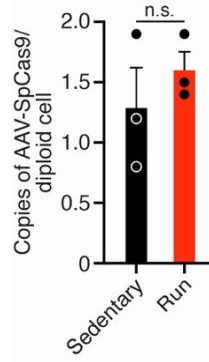
**Figure S4. Corrected  $\Delta$ Ex44 mice retain dystrophin positive fibers in diaphragm, tibialis anterior, and quadricep muscles following 4 weeks of downhill running.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed ( $n = 6$ ).



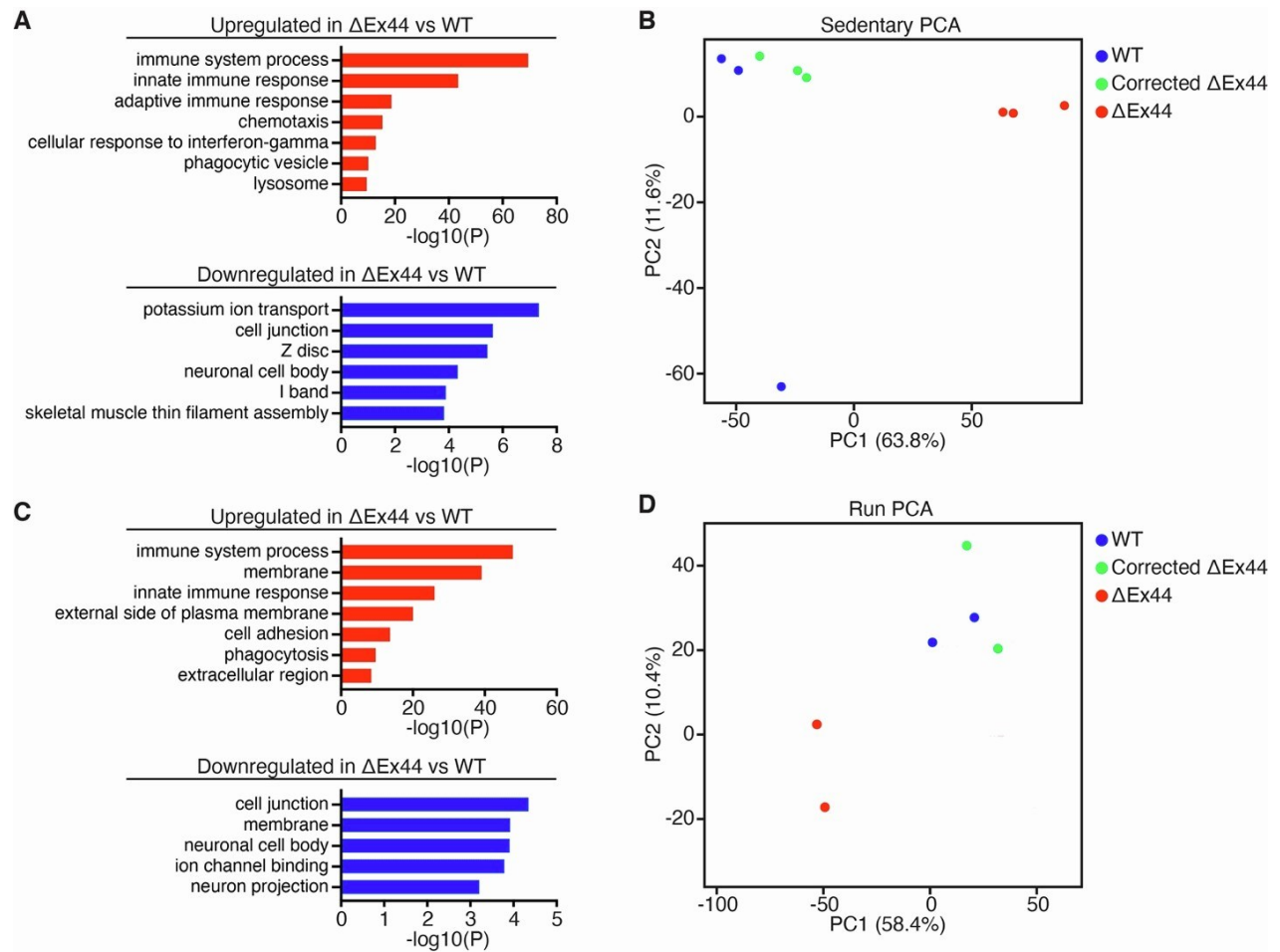
**Figure S5. Corrected  $\Delta$ Ex44 mice retain dystrophin positive fibers in the EDL and soleus muscles following 4 weeks of downhill running.** (A) Immunohistochemistry shows retention of dystrophin positive fibers in the EDL and soleus muscles in corrected  $\Delta$ Ex44 mice following 4 weeks of downhill running. Dystrophin is shown in green. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Quantification of the percentage of dystrophin positive fibers in EDL and soleus muscles. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed ( $n \geq 5$ ). (C) Western blot analysis shows retention of dystrophin protein in the EDL and soleus muscles of corrected  $\Delta$ Ex44 mice following 4 weeks of downhill running. Vinculin was loading control. (D) Quantification of dystrophin protein in EDL and soleus. Dystrophin protein levels were first normalized to vinculin and then to WT sedentary controls. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed ( $n = 3$ ).



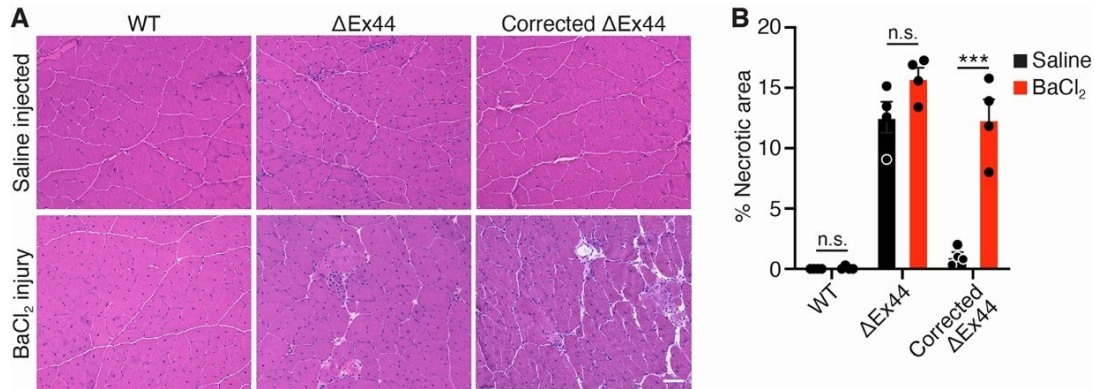
**Figure S6. INDEL frequency at the sgRNA target site in corrected  $\Delta$ Ex44 mice does not change with downhill running.** Reframing refers to INDELs (+1 or -2 nucleotide(s)) that reframe exon 45 and restore the dystrophin open reading frame. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed (n = 3).



**Figure S7. Corrected  $\Delta$ Ex44 mice retain AAV-SpCas9 viral genomes in the quadriceps muscle following 4 weeks of downhill running.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed (n = 3).

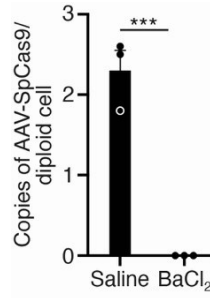


**Figure S8. Additional transcriptional comparisons between WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 before and after downhill running.** (A) Selected GO terms of up- and down-regulated genes in  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscle relative to WT. (B) Principal component analysis of transcriptomes from WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscle. (C) Selected GO terms of up- and down-regulated genes in downhill run  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscle relative to WT. (D) Principal component analysis of transcriptomes from WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscles following 4 weeks of downhill running.

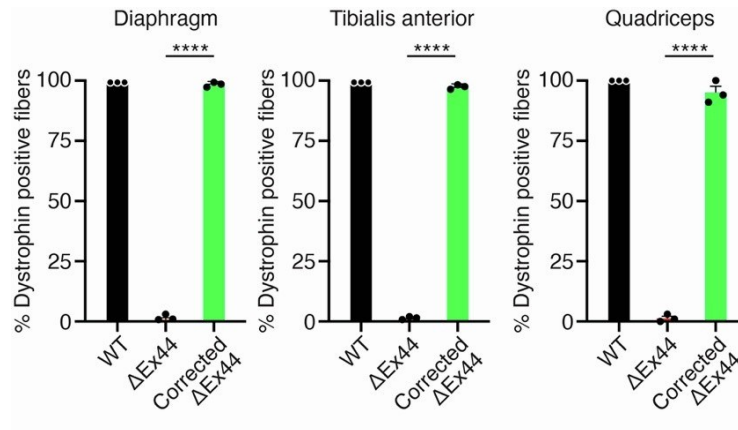


**Figure S9. Corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscle exhibits muscle necrosis two months following acute injury induced by BaCl<sub>2</sub>.** (A) H&E staining of WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscles two months following BaCl<sub>2</sub> or saline injection. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Quantification of necrosis in WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscles two months following BaCl<sub>2</sub> or saline injection. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\*\*P<0.001 (n = 4).

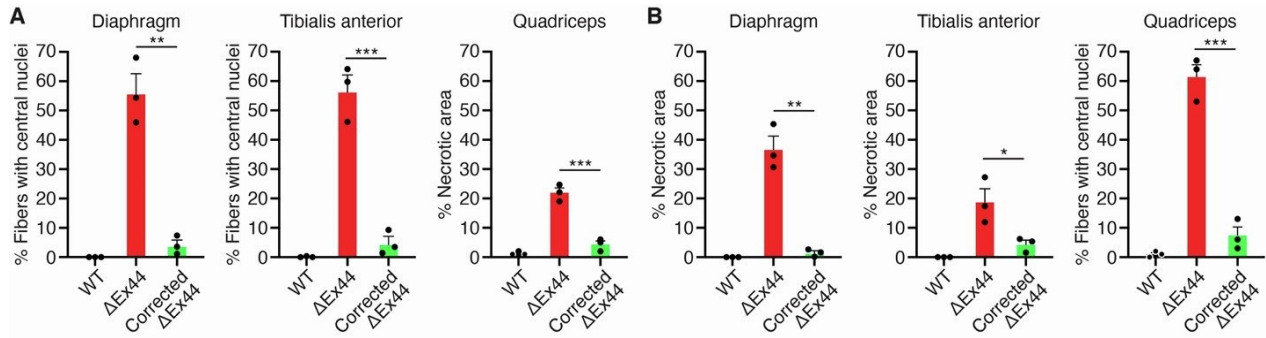




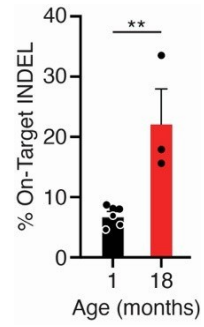
**Figure S10. AAV-SpCas9 viral genomes are lost following BaCl<sub>2</sub> induced injury.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\*\*P<0.001 (n = 3).



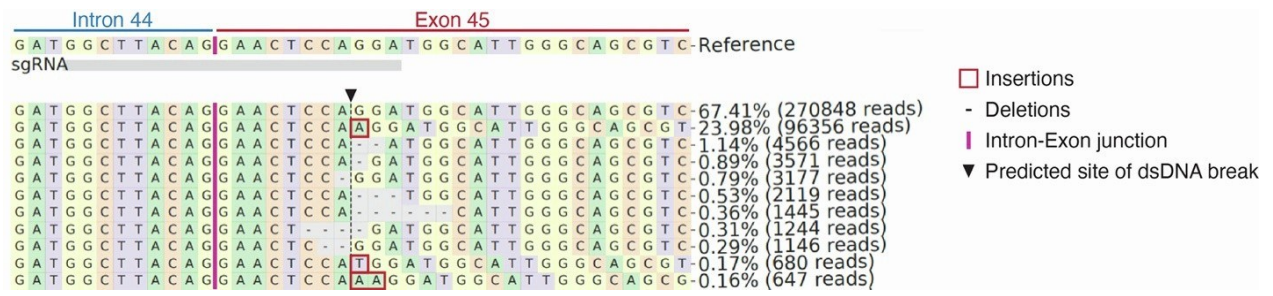
**Figure S11. 18-month-old corrected  $\Delta$ Ex44 mice retain dystrophin positive fibers in diaphragm, tibialis anterior and quadriceps muscles.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\*\*\*P<0.0001 (n=3).



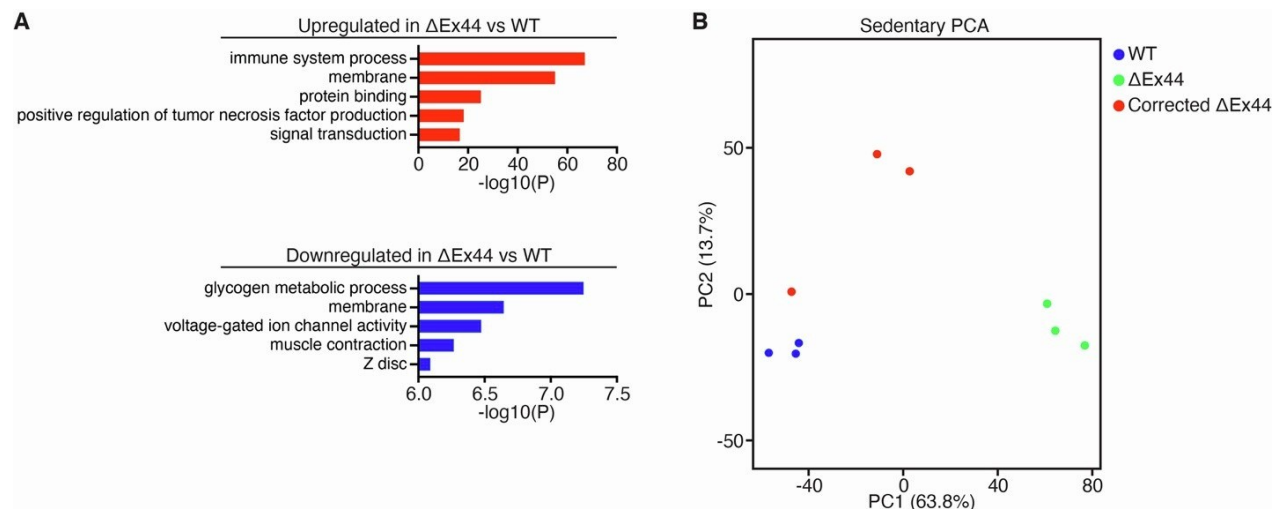
**Figure S12. 18-month-old corrected  $\Delta$ Ex44 mice exhibit significantly reduced histological markers of muscle degeneration.** (A) Quantification of centralized nuclei in the diaphragm, tibialis anterior and quadriceps muscles from 18-month-old WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 mice. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n = 3$ ). (B) Quantification of necrosis in the diaphragm, tibialis anterior and quadriceps muscles from 18-month-old WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 mice. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n = 3$ ).



**Figure S13. On-target INDEL comparison between 4-week-old and 18-month-old corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscle.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t-test was performed. \*\* $P < 0.005$  ( $n \geq 3$ ).



**Figure S14. Genomic edits at the on-target site in 18-month-old corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscles.**



**Figure S15. Additional transcriptional comparisons between 18-month-old WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscles.** (A) Selected GO terms of up- and down-regulated genes in 18-month-old  $\Delta$ Ex44 quadriceps relative to WT. (B) Principal component analysis of transcriptomes from 18-month-old WT,  $\Delta$ Ex44, and corrected  $\Delta$ Ex44 quadriceps muscle.

**Table S1. Amplicon-based deep sequencing of 18-month-old corrected  $\Delta$ Ex44 tibialis anterior muscle.**

Sample ID	Total Editing %	Total Reframing %	Most Common Reframing Events		% AAV Integration at Target Site
			+1 nt %	-2 nt %	
Corrected $\Delta$ Ex44 TA #1	18.35	15.9	14.15	1.19	0.14
Corrected $\Delta$ Ex44 TA #2	21.25	17.96	16.95	0.87	0.37
Corrected $\Delta$ Ex44 TA #3	31.1	26.42	24.28	1.47	0.47

**Table S2. Primers used for AAV-SpCas9 copy number analysis and for on-target TIDE.**

<b>Experiment Name</b>	<b>Primer Name</b>	<b>Primer Sequence</b>
AAV-SpCas9 Copy Quantification	SpCas9-F	TGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATC
	SpCas9-R	TTGTCCTTGATAATTTTCAGCAGATC
TIDE Analysis of On-target Editing	mEx45-TIDE-F	CCCTGAGCTGAAGTGAGAGG
	mEx45-TIDE-R	ACCTCTTCTCCTTTCTGCCAG



**Table S3. Primers for amplicon-based deep sequencing.**

Primers for on and off-target amplicon-based deep sequencing			
Site	Sequence (5'-3')	Product	miSeq Primers with Adapter
ON-TARGET	CCCTGAGCTGAAGTGAGAGG	404	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGAGCTGAAGTGAGAGG
	ACCTCTTCTCCTTTCTGCCAG		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCTCTTCTCCTTTCTGCCAG
OFF-TARGET 1	CTGCCCAACAAGAGCATTCTAAG	374	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGCCCAACAAGAGCATTCTAAG
	AGCCACTGTTTAACTTGCAGTCAC		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCACTGTTTAACTTGCAGTCAC
OFF-TARGET 2	CTTCTCCTCCACCCTCACAG	356	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCTCCTCCACCCTCACAG
	TCCTGTTACATGTCCCGACAC		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCTGTTACATGTCCCGACAC
OFF-TARGET 3	CTCAGAGAGTCGATGGAACCTCCTG	442	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTCAGAGAGTCGATGGAACCTCCTG
	TCCTATGGGGTCAATTTCTGCACA		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTATGGGGTCAATTTCTGCACA
OFF-TARGET 4	GGTTCCTCAAAATGCCCTGTGTGA	487	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTTCCTCAAAATGCCCTGTGTGA
	TCTCCTGGAGGGGTGAAAGAAAAG		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCCTGGAGGGGTGAAAGAAAAG
OFF-TARGET 5	TGTGGGACTGCTAGAAAAGTTTGGA	440	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGGGACTGCTAGAAAAGTTTGGA
	GATCCCCGCCGAGTTTATTAGT		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGATCCCCGCCGAGTTTATTAGT
OFF-TARGET 6	TGGACAAGGAGCAAACAAAAGCT	413	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGACAAGGAGCAAACAAAAGCT
	TTTATGGACAGTTGAGGTGCCAGA		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTATGGACAGTTGAGGTGCCAGA
OFF-TARGET 7	AAGGGACAGCTCAAAGACCTTCTT	398	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAGGGACAGCTCAAAGACCTTCTT
	ACTTCAAACGCACTGTCACATCAG		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTTCAAACGCACTGTCACATCAG
OFF-TARGET 8	TCTGAAGAAGCCCTTGGTCATTCA	459	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTGAAGAAGCCCTTGGTCATTCA
	ATCCTCTACACGTAACAGGAAGCC		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCCTCTACACGTAACAGGAAGCC
OFF-TARGET 9	GAAGGCAGTCAAGCAGATTGGATC	414	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGGCAGTCAAGCAGATTGGATC
	ACTAGCAGCCTTTGGATGAAGACA		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTAGCAGCCTTTGGATGAAGACA
OFF-TARGET 10	ATGACGACGACGACAATGTTGATG	445	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGACGACGACGACAATGTTGATG
	CCTCAAAGCCTTCTTGAAGGAAGC		GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTCAAAGCCTTCTTGAAGGAAGC