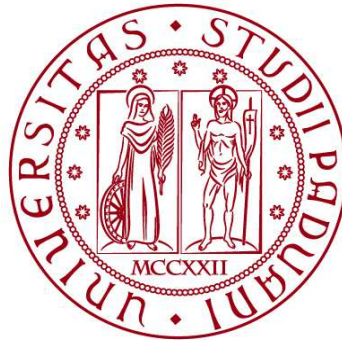


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**RIMOZIONE DEI SITI DI OSSIDAZIONE NELLA PROTEINA  
CAMKII $\delta$  TRAMITE CRISPR-CAS9 COME TERAPIA PER LE  
MALATTIE CARDIACHE**

**Tutor: Prof.ssa Alessandro Rampazzo  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Sara Vencato  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Daisy Ferracin**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## **Indice**

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>1. STATO DELL'ARTE.....</b>	<b>1</b>
1.1 CRISPR-CAS9.....	1
1.1.1 <i>Base editing</i> .....	2
1.2 PROTEINE CAMK.....	3
1.2.1 <i>Regolazione di CaMKII</i> .....	4
1.2.2 <i>CaMKII<math>\delta</math> nelle malattie cardiache</i> .....	5
1.3 ISCHEMIA/RIPERFUSIONE.....	5
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>7</b>
3.1 SANGER SEQUENCING.....	7
3.2 ISCHEMIA/RIPERFUSIONE SIMULATA IN VITRO.....	7
3.3 WESTERN BLOT.....	8
3.4 ISCHEMIA/RIPERFUSIONE IN TOPI ADULTI.....	8
3.5 RNA SEQUENCING.....	9
3.6 ANALISI ISTOLOGICHE.....	9
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>10</b>
4.1 PROGETTAZIONE DELLA STRATEGIA DI EDITING GENETICO TRAMITE SEQUENZIAMENTO SANGER ..	10
4.2 ANALISI DI WESTERN BLOT IN CARDIOMIOCITI DERIVATI DA iPSCs.....	11
4.3 ANALISI DELLA FUNZIONE CARDIACA POST-IR NEI TOPI.....	13
4.4 ANALISI DELL'EFFICIENZA DI EDITING E DEL POTENZIALE EDITING OFF-TARGET NEL TESSUTO CARDIACO MURINO.....	14
4.5 ANALISI DEL TRASCRIPTOMA CARDIACO POST-IR TRAMITE RNA SEQUENCING.....	16
4.6 VALUTAZIONE DEGLI EVENTI DI MORTE CELLULARE E FIBROSI POST-IR TRAMITE ANALISI ISTOLOGICHE.....	18
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>20</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>23</b>



## **Abstract**

L'editing del genoma è una tecnica che prevede di modificare o sostituire con grande precisione nucleotidi interessati da mutazioni genomiche. La più recente tecnica di editing si basa sul sistema CRISPR-Cas9 ovvero su un'endonucleasi (Cas9) in grado di introdurre tagli all'interno della doppia elica di DNA in posizioni specifiche. In questo caso si dimostra che il sistema CRISPR-Cas9 ha un ampio potenziale nel trattamento di pazienti affetti da malattie cardiache. In particolare, è stato osservato che l'iper-attivazione della protein chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dipendente II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ), un importante regolatore della segnalazione cellulare nei cardiomiociti, è direttamente implicata in infarti miocardici, danni da ischemia/riperfusione, aritmie e arresti cardiaci. Dal momento che l'iper-attivazione avviene a causa dell'ossidazione di due residui di metionina localizzati nella sequenza proteica di CaMKII $\delta$ , l'editing genomico è volto ad eliminare questo sito di attivazione ossidativa in cardiomiociti derivati da cellule staminali umane pluripotenti indotte. L'editing del gene CaMKII $\delta$  può quindi rappresentare una strategia permanente per la terapia di malattie cardiache.

## **1. Stato dell'arte**

### **1.1 CRISPR-Cas9**

CRISPR-Cas è un sistema di immunità adattativa proprio di batteri e archea che fornisce protezione da acidi nucleici estranei. Il locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) è costituito da una sequenza leader seguita da brevi sequenze di DNA ripetute separate tra di loro da sequenze spaziatrici di dimensioni simili che hanno origine da DNA fagico o plasmidico. Al locus CRISPR possono essere associati i geni Cas. La trascrizione del locus CRISPR genera un lungo trascritto primario detto pre-crRNA che è ulteriormente processato a formare un insieme di corti crRNAs contenenti un singolo spaziatore fiancheggiato da frammenti ripetuti (Karvelis et al., 2013).

Il sistema CRISPR-Cas può essere diviso in due classi a seconda del numero e del tipo di proteine Cas coinvolte. Il sistema di classe 1 necessita di molteplici proteine Cas mentre il sistema di classe 2 si basa su una singola proteina Cas costituita da domini multipli. Le due componenti principali del sistema CRISPR-Cas9 sono la nucleasi Cas9 e il single guide RNA (sgRNA), formato dall'ibridazione di un tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) e un crRNA (CRISPR-RNA). Il crRNA è composto da una sequenza di ~20 nucleotidi (protospacer) complementare al DNA target che, per essere riconosciuto, deve essere affiancato dalle sequenze PAM (Protospacer adjacent motif). La PAM è una breve sequenza (3-5 basi) batterio-specifica situata sul DNA fagico. Il tracrRNA, codificato da un gene esterno al locus CRISPR, si ibrida al crRNA e si lega alla nucleasi

Cas9 formando un complesso ribonucleoproteico (RNP) (Zhang et al., 2021). Esso riconosce la sequenza bersaglio nell'acido nucleico virale grazie al crRNA e induce un taglio sito-specifico, prevenendo così la propagazione e la proliferazione di elementi genetici estranei (Karvelis et al., 2013).

Dotando di CRISPR cellule che ne sono prive, è possibile utilizzare questo sistema come forbice molecolare estremamente precisa per eliminare sequenze di DNA dannose dal genoma bersaglio o per sostituire delle sequenze correggendo delle mutazioni causa di malattie.

Nel genoma target il DSB può essere riparato tramite NHEJ (Non homologous end joining) o tramite HDR (Homology-directed repair). NHEJ è soggetto ad errori e solitamente porta a indels nel sito di rottura: se delezioni/inserzioni spostano il frame di lettura possono condurre a knock-out genico. HDR richiede invece un DNA stampo contenente una sequenza omologa al sito di rottura per riparare il genoma della cellula in proliferazione. Sfruttando il meccanismo HDR si possono quindi riparare le mutazioni causa di malattia o inserire sequenze di interesse nel punto di rottura per ottenere il genotipo desiderato (Zhang et al., 2021).

La strategia di editing basata su CRISPR può essere somministrata *in vivo* (direttamente nell'organismo) o *ex vivo* (su cellule vive prelevate dall'organismo).

### **1.1.1 Base editing**

Il base editing è uno strumento di modifica del genoma che permette di modificare con precisione una singola base nel locus target senza causare DSB. I base editors implicano la fusione della nucleasi Cas9 con una deaminasi del DNA a singolo filamento. Sono state sviluppate due classi principali di base editors: cytosine base editor (CBE), che converte la coppia di basi C•G in T•A, e adenine base editor (ABE), che converte la coppia di basi A•T in G•C (Liu et al., 2022). ABE, l'editor utilizzato in questa sperimentazione, è costituito da un'adenosina deaminasi tRNA specifica di *Escherichia Coli* (TadA) e la proteina Cas9.

In particolare, la deaminazione dei nucleotidi C o A genera prima uridina e inosina creando un mismatch con i nucleotidi G e T rispettivamente presenti nel filamento non deaminato. Successivamente, il meccanismo di riparazione del DNA introduce una A o una C sul filamento opposto che a sua volta viene utilizzato come stampo per riparare il filamento deaminato. Si converte così C in T e A in G. CBE e ABE possono mediare tutte le quattro possibili transizioni (ma non le transversioni) (Liu et al., 2022).

In questo caso ABE è stato usato per rendere CaMKII $\delta$  insensibile all'attivazione ossidativa. In particolare il codone ATG nel dominio regolatorio di CaMKII $\delta$  è stato

convertito nel codone GTG sostituendo le metionine sensibili all'ossidazione con valine.

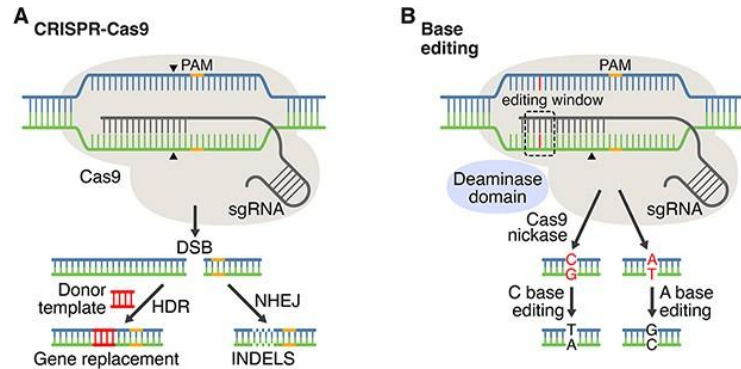


Figura 1: Sistemi CRISPR-Cas per l'editing del genoma; tratto da: Liu et al., 2022

## 1.2 Proteine CaMK

Il calcio è il secondo messaggero universale nelle cellule eucariotiche. I cambiamenti della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare giocano un ruolo fondamentale in molte funzioni cellulari come la trascrizione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'esocitosi, la sintesi delle proteine e la motilità, e spesso hanno ruoli diversi all'interno della singola cellula. Il principale recettore intracellulare del  $\text{Ca}^{2+}$  è la calmodulina (CaM), un piccolo, e altamente conservato sensore del  $\text{Ca}^{2+}$  che è ubiquitariamente espresso nelle cellule mammifere. Quando quattro siti di legame della calmodulina sono occupati dal calcio, la CaM va incontro ad un cambiamento conformazionale e diviene capace di interagire con i suoi bersagli nella cellula. Una delle maggiori famiglie di effettori del complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  è rappresentata dalle protein chinasi  $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulina}$  dipendenti (CaMKs), ossia delle serin/treonin chinasi. Le CaMKs possono essere divise in CaMKs che fosforilano un singolo e specifico substrato e CaMKs multifunzionali come CaMKI, CaMKII e CaMKIV, che fosforilano un ampio numero di proteine.

Le CaMKs presentano una porzione regolatoria contenente un dominio autoinibitorio che interagisce con un dominio catalitico e mantiene inattivo l'enzima a livelli di riposo di calcio. Quando invece il complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  si lega alla regione adiacente del dominio autoinibitorio avviene un cambiamento conformazionale che permette l'accesso dell'ATP e del substrato dell'enzima al dominio catalitico.

Le CaMKs differiscono nella distribuzione tissutale e subcellulare. CaMKI e CaMKII sono ubiquitariamente espresse, mentre CaMKIV è tessuto specifica ed è espressa principalmente nel cervello, nel timo, nei testicoli, nell'ovaio, nel midollo osseo e nelle ghiandole adrenali. Mentre CaMKIV è principalmente nucleare e CaMKI sembra essere sia citoplasmatica che nucleare, la distribuzione subcellulare di CaMKII può variare (Rusciano, 2010).

### 1.2.1 Regolazione di CaMKII

Le proteine CaMKII si distinguono in 4 isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , ciascuna codificata da un gene diverso e con una diversa espressione tessuto-specifica. CaMKII $\alpha$  e  $\beta$  sono espresse prevalentemente nel tessuto neuronale mentre le isoforme CaMKII $\delta$  e  $\gamma$  possono trovarsi in quasi tutti i tipi cellulari. CaMKII $\delta$  e  $\gamma$  sono le principali isoforme rinvenute nel tessuto cardiaco, con l'isoforma  $\delta$  che supera l'isoforma  $\gamma$  di ~2,5 volte. Un'altra caratteristica di CaMKII è la sua associazione in un complesso multimerico. L'enzima multimerizza attraverso il dominio di associazione per formare un oloenzima di 12 subunità. Ogni monomero consiste di un dominio catalitico all'N-terminale e un dominio di associazione al C-terminale. Nel mezzo, il dominio auto-regolatorio, che include il sito di legame del complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , regola lo stato di attivazione attraverso il legame con  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  e tramite auto-fosforilazione. All'interno del dominio regolatorio esiste un dominio autoinibitorio che si sovrappone al dominio di legame con la CaM. In assenza di  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , CaMKII è inibita stericamente dalla regione autoinibitoria, che si pensa che prevenga sia il legame al substrato che all'ATP. Il legame della  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  al dominio regolatorio conduce ad un cambiamento conformazionale che espone i siti di legame presenti nel dominio catalitico all'ATP e al substrato. Quando un monomero entra nello stato attivo, i domini regolatori dei monomeri adiacenti sono in grado di auto-fosforilarsi a livello della Thr287 promuovendo l'attivazione dell'oloenzima CaMKII e bloccando la riassociazione del dominio catalitico al dominio auto-inibitorio. Viene così mantenuta l'attività chinasi anche dopo la dissociazione del complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ .

L'auto-fosforilazione della Thr287 ha anche un altro effetto detto "CaM trapping": esso consiste nell'aumento dell'affinità di legame di CaM di 1000 volte mantenendo l'attività di CaMKII anche in condizioni di basse concentrazioni di calcio intracellulari. Un altro meccanismo di attivazione di CaMKII prevede delle modifiche post-traduzionali nel dominio regolatorio che sono  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  indipendenti. Un esempio è l'ossidazione dei residui Met281/Met282 da parte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalla NADPH ossidasi e dai mitocondri. Questa ossidazione impedisce l'associazione del dominio catalitico con il dominio auto-inibitorio dunque CaMKII rimane attiva anche in assenza del complesso  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ .

Infine CaMKII può essere inattivata tramite de-fosforilazione di Thr287 da parte della protein fosfatasi 2A o della protein fosfatasi 1. Un altro meccanismo di regolazione negativa indipendente dalle fosfatasi prevede l'auto-fosforilazione della Thr305/306 che impedisce a CaM di legarsi nuovamente al dominio regolatore (Beckendorf et al., 2018).



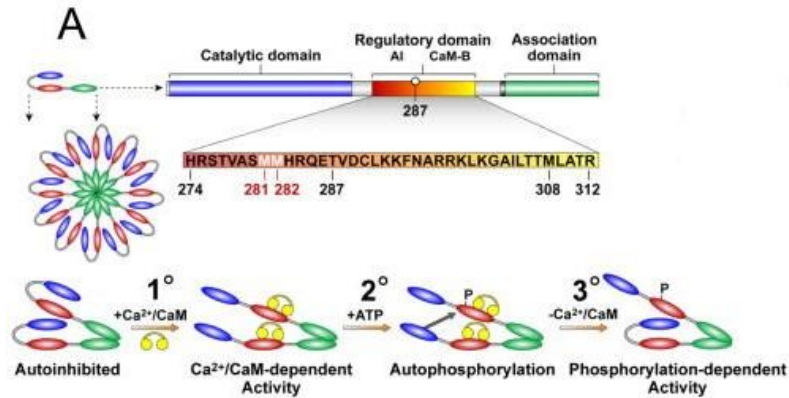


Figura 2: Struttura generale di una subunità dell'oloenzima CaMKII e meccanismo di attivazione tramite auto-fosforilazione; tratto da: Erickson et al., 2008

### 1.2.2 CaMKII $\delta$ nelle malattie cardiache

CaMKII $\delta$  è attivata in diverse malattie con una componente infiammatoria come l'infarto miocardico, i danni da ischemia/riperfusion, l'ipertrofia e le aritmie cardiache, in cui regola attivamente una segnalazione pro-infiammatoria.

In particolare, CaMKII $\delta$  fosforila le proteine coinvolte nel trasporto del calcio nel reticolo sarcoplasmatico, compresi i recettori cardiaci della rianodina (RyR2) e il fosfolambano (PLB). La fosforilazione di RyR2 induce un aumento della probabilità di apertura del suo canale mentre la fosforilazione di PLB attiva la pompa SERCA che riassorbe il calcio nel reticolo sarcoplasmatico (Rusciano et al., 2019). L'alterazione della concentrazione intracellulare di calcio è coinvolta nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca (Zhang et al., 2007).

Infine CaMKII $\delta$  è anche implicata nella regolazione trascrizionale associata allo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca. (Zhang et al., 2007) L'isoforma CaMKII $\delta_B$  infatti possiede una sequenza di localizzazione nucleare ed è quindi altamente presente nei nuclei dei cardiomiociti (Beckendorf et al., 2018).

### 1.3 Ischemia/riperfusion

Con il termine ischemia si definisce l'ipoperfusione dei tessuti. Diverse condizioni come sepsi, sindrome coronarica acuta, trapianto di organi e lesioni agli arti possono causare ipoperfusione tissutale. Il ripristino del flusso sanguigno al tessuto ischemico può favorire il recupero delle cellule se il danno da queste subito è reversibile. La riperfusion può causare però un aggravamento del danno con conseguente perdita di un ulteriore numero di cellule oltre a quelle danneggiate irreversibilmente dall'ischemia. Questo fenomeno è noto come lesione da ischemia/riperfusion.

L'ostruzione del flusso sanguigno arterioso provoca ipossia e porta alla disfunzione della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri. La diminuzione della produzione di ATP nei mitocondri induce il metabolismo anaerobico, la disfunzione

delle pompe sodio-potassio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi) e delle pompe del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi) nel reticolo endoplasmatico. Il malfunzionamento delle pompe provoca la ritenzione di sodio e di calcio all'interno delle cellule e di potassio fuori dalle cellule. L'elevata concentrazione di sodio nelle cellule diminuisce anche l'attività dello scambiatore sodio-idrogeno. L'accumulo di ioni idrogeno, sodio e calcio all'interno delle cellule causa iper-osmolarità che a sua volta porta al flusso di acqua nel citoplasma e al rigonfiamento cellulare.

In seguito alla riperfusione, il ripristino del flusso sanguigno al tessuto ischemico fornisce ossigeno attraverso i globuli rossi. Parallelamente, la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) aumenta a causa di una minore concentrazione di agenti antiossidanti nelle cellule ischemiche. I ROS a loro volta causano stress ossidativo che promuove la disfunzione endoteliale (ridotta vasodilatazione, attività pro-coagulante e pro-infiammatoria), danni al DNA e risposte infiammatorie locali. La cascata infiammatoria e lo stress ossidativo possono poi indurre un'enorme produzione di citochine, con conseguente morte cellulare dovuta a danni alle strutture cellulari.

Una moderata lesione da ischemia/riperfusione può indurre l'autofagia come meccanismo di sopravvivenza. Se invece la lesione è grave, la morte cellulare può essere attivata tramite la via apoptotica o la via necrotica.

Le manifestazioni cliniche del danno da ischemia/riperfusione comprendono ibernazione miocardica, insufficienza cardiaca acuta, disfunzione cerebrale, disfunzione gastro-intestinale, sindrome da risposta infiammatoria sistemica e sindrome da disfunzione multi-organo. Gli approcci terapeutici sono diversi a seconda dell'organo leso. In particolare, pazienti colpiti da infarto miocardico acuto sono sottoposti a ri-vascularizzazione, la cui complicanza più comune è l'aritmia da riperfusione (Wu et al., 2018).

## **2. Scopo dello studio**

La maggior parte delle strategie di editing CRISPR-Cas9 si focalizza sulla correzione di specifiche mutazioni genetiche che interessano un piccolo gruppo di pazienti, limitando un'applicazione più ampia dell'approccio. In questo caso, è stata invece progettata una terapia basata su CRISPR-Cas9 potenzialmente applicabile a molti individui adulti affetti da malattie cardiovascolari, la principale causa di morbilità e mortalità nel mondo.

Il bersaglio di questa strategia di editing è il gene codificante la protein chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dipendente II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ), un regolatore centrale della funzionalità e della segnalazione cardiaca. In particolare, l'obiettivo dello studio è quello di impedire l'iper-attivazione cronica di CaMKII $\delta$ , responsabile di diverse malattie

cardiache in uomo e in topo, comprese lesioni da ischemia/riperfusion (IR), insufficienza cardiaca, ipertrofia cardiaca e aritmie.

### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1 Sanger sequencing**

L'editing di CaMKII $\delta$  ha richiesto di testare sei diversi sgRNAs che coprissero la regione genomica codificante per le metionine 281 e 282, ossia rispettivamente l'adenina in posizione c.841 e c.844. Per fare ciò sono state utilizzate le cellule HEK293, ovvero cellule di rene embrionale umano. I sgRNAs sono stati testati con due base editors, ABEmax e ABE8e, in cui le deaminasi sono state fuse con la nucleasi SpCas9 o con la sua variante SpRY. SpCas9 riconosce la sequenza PAM 5'-NGG-3' mentre SpRY riconosce preferibilmente la sequenza 5'-NRN-3' (con R = A o G) (Liang et al., 2022). Il sequenziamento Sanger è stato utilizzato per identificare i componenti di base editing con la migliore efficienza. Il DNA genomico delle cellule HEK293 è stato isolato utilizzando il reagente "DirectPCR cell lysis" con la proteinasi K. Il DNA è stato poi amplificato con la DNA polimerasi PrimeSTAR GXL. Infine l'efficienza di editing è stata determinata analizzando i cromatogrammi tramite l'algoritmo EditR.

#### **3.2 Ischemia/riperfusion simulata in vitro**

I componenti per l'editing di CaMKII $\delta$  sono stati inseriti in cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSCs) tramite nucleofezione, ossia una tecnica che, sfruttando impulsi elettrici e soluzioni saline, permette ad acidi nucleici esogeni di penetrare direttamente all'interno del nucleo. Per studiare le conseguenze fisiologiche dei due modelli di editing più efficienti nelle cellule HEK293, sono state generate tre linee iPSC omozigoti con sgRNA1, sgRNA6 o nessun sgRNA (wild-type) e sono state differenziate in cardiomiociti (iPSC-CMs).

In queste cellule è stata simulata l'ischemia/riperfusion tramite una camera di ipossia. Il classico terreno di coltura dei cardiomiociti (RPMI/B27) è stato sostituito con ischemia Esumi buffer e i cardiomiociti sono stati posizionati in incubatore a 37°. I cardiomiociti sono stati sottoposti a ischemia simulata per cinque ore. Nel frattempo, cardiomiociti di controllo sono stati esposti ad un terreno di coltura normossico. Dopo cinque ore, i buffer ischemico e normossico sono stati sostituiti con terreno di coltura fresco (RPMI/B27) e le cellule sono state incubate per 14 ore di riperfusion per poi essere analizzate.

### **3.3 Western blot**

In seguito a IR, è stato effettuato un Western blot sui cardiomiociti derivati da iPSCs. Il western blot aveva lo scopo di misurare nei vari campioni la quantità di CaMKII ossidata grazie ad un anticorpo specifico per la forma ossidata dell'enzima.

Le proteine sono state isolate utilizzando il buffer RIPA integrato con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi. La sonicazione con Bioruptor Pico è stata utilizzata per rompere il DNA genomico. I campioni sono stati quindi centrifugati per 15 minuti a 10.000g a 4° e il surnatante è stato conservato a -80°. La concentrazione proteica è stata misurata con il metodo BCA (metodo dell'acido bicinconico) e uguali quantità di proteine sono state caricate sul Mini-PROTEAN® TGX™ gel. In seguito alla corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su una membrana di PVDF (fluoruro di polivinilidene) saturata con latte e incubata a 4° tutta la notte con uno degli anticorpi primari: anticorpo policlonale di coniglio anti-oxCaMKII, anticorpo policlonale di coniglio anti-pCaMKII, anticorpo monoclonale di topo anti-CaMKII, anticorpo policlonale di coniglio anti-pRyR2, anticorpo policlonale di coniglio anti-RyR2 e anticorpo monoclonale di topo anti-GAPDH. Gli anticorpi secondari erano anticorpi anti-rabbit e anticorpi anti-mouse coniugati con la perossidasi di rafano (HRP) e sono stati incubati con la membrana per un'ora a temperatura ambiente. Il rilevamento è stato eseguito con ChemiDoc MP Imaging System utilizzando il luminolo come substrato di HRP.

### **3.4 Ischemia/riperfusion in topi adulti**

Topi maschi wild-type del ceppo C57B/6 di 12 settimane sono stati sottoposti ad un intervento di ischemia/riperfusion dopo essere stati anestetizzati. La toracotomia è stata effettuata tra la quarta e la quinta costola sinistra ed è stata applicata una sutura in nylon sotto l'arteria coronaria discendente anteriore sinistra per provocare 45 minuti di ischemia. La sutura è stata poi rilasciata e i componenti di ABE, inseriti nel virus adeno-associato di sierotipo 9 (AAV9), sono stati iniettati direttamente nell'area lesionata del cuore. Dato che l'editing con sgRNA6 aveva conferito maggiore protezione agli iPSC-CMs rispetto a sgRNA1, è stato utilizzato sgRNA6 combinato con ABE8e-SpRY per rimuovere i siti di ossidazione di CaMKII $\delta$  in topo. Per assicurare l'espressione di ABE solo nel tessuto cardiaco, è stato utilizzato il promotore della troponina T cardiaca (cTnT). Mentre a otto topi è stato iniettato un sistema ABE funzionale (IR+Edit), altri otto topi hanno ricevuto un'iniezione con un virus di controllo non funzionante (IR+Control Virus). Altri otto topi sono stati sottoposti a IR senza alcuna iniezione e altri otto hanno subito un intervento a torace aperto per 45

minuti senza iniezioni e senza IR. Infine, la ferita è stata attentamente suturata su tutti i topi e a questi è stato permesso di riprendersi.

È stato eseguito un ecocardiogramma su ogni topo prima dell'IR, così come 24 ore dopo, una settimana dopo, due settimane dopo e tre settimane dopo. La risonanza magnetica cardiaca è stata fatta in cinque topi per gruppo quattro settimane dopo l'IR. Dopo cinque settimane, a tutti i topi è stata praticata l'eutanasia: cinque topi per gruppo sono stati destinati alle analisi molecolari e tre topi alle analisi istologiche.

### **3.5 RNA sequencing**

L'RNA sequencing è stato utilizzato per analizzare il trascrittoma cardiaco dei vari topi trattati in seguito a IR.

I campioni cardiaci congelati di topo sono stati omogeneizzati in TRIzol utilizzando un omogeneizzatore. RNeasy Micro Kit è stato utilizzato per isolare l'RNA mentre il kit KAPA mRNA HyperPrep è stato usato per preparare le librerie di sequenziamento dell'RNA. Il sequenziamento single-ended è stato eseguito tramite il sequenziatore Illumina NextSeq500 dalla "University of Texas Southwestern Medical Center CRI Sequencing Facility".

Per identificare le reads a bassa qualità e gli adattatori di sequenziamento sulle reads è stato utilizzato FastQC. Per eseguire il trimming delle reads, ossia per processare i dati di sequenziamento grezzi, è stato impiegato il tool Trimmomatic e le trimmed reads sono state allineate al genoma di topo di riferimento utilizzando il programma HISAT2. Infine, le analisi di Gene Ontology sono state eseguite utilizzando Metascape con i geni up-regolati e down-regolati come input.

### **3.6 Analisi istologiche**

Per effettuare le analisi istologiche, i cuori di topo sono stati fissati in formalina tutta la notte a temperatura ambiente e sono stati lavati in PBS. I campioni sono stati disidratati in etanolo al 70% e sono stati fatti infiltrare dalla paraffina. Infine i campioni sono stati tagliati in sezioni trasversali di 1,5  $\mu\text{m}$  che sono state montate su vetrini e sottoposte a colorazione tricromica. Il tessuto fibroso è stato quantificato tramite il programma ImageJ dividendo l'area occupata dal collagene per l'area totale della sezione.

La colorazione TUNEL per le cellule apoptotiche e l'immunoistochimica per la rilevazione della troponina I sono state fatte sulla stessa sezione. Le sezioni sono state deparaffinate in xilene e immerse in etanolo a concentrazioni decrescenti. È stato poi eseguito lo smascheramento degli antigeni e il bloccaggio dei siti non specifici con normale siero di capra. L'anticorpo primario era un anticorpo policlonale di coniglio anti-troponina I con cui sono state incubate le sezioni tutta la notte a 4°.

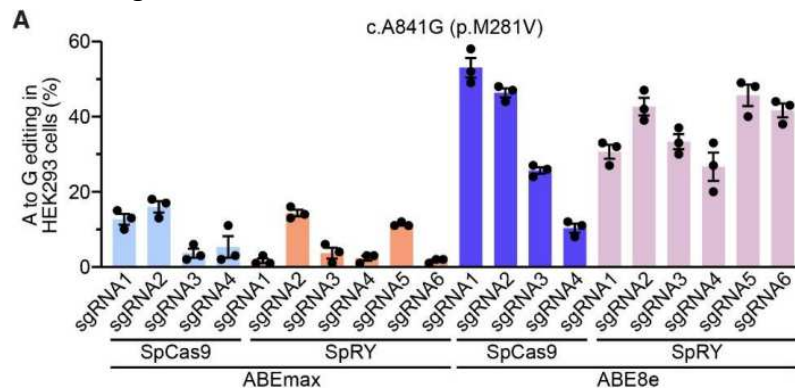
Successivamente le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con Cy3 (cianina 3) per 30 minuti a temperatura ambiente. Per concludere l'immunoistochimica, gli antigeni, gli anticorpi primari e secondari nelle sezioni sono stati cross-linkati con paraformaldeide per stabilizzare la struttura del tessuto.

Il saggio TUNEL è un metodo attraverso il quale è possibile identificare gli eventi di apoptosi cellulare. Nel processo apoptotico, infatti, le endonucleasi digeriscono il DNA, producendo numerosi frammenti con estremità 3'-OH libere. Il saggio TUNEL identifica le cellule apoptotiche attraverso l'inserimento di nucleotidi fluorescenti (dUTP) mediato dall'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT) alle estremità 3'-OH del DNA che ha subito rotture. La fluorescenza viene successivamente rilevata con citofluorimetria o con microscopia a fluorescenza.

## 4. Risultati

### 4.1 Progettazione della strategia di editing genetico tramite sequenziamento Sanger

Dai risultati ottenuti tramite sequenziamento Sanger, si nota che l'editing dell'adenina c.841 con migliore efficienza si ottiene utilizzando il sgRNA1 combinato con ABE8e fuso con SpCas9. Questa strategia di editing, tuttavia, non modifica l'adenina c.844, dunque non converte la metionina 282 in valina. In figura 3A si nota infatti che la percentuale di A in posizione c.841 convertite in G nelle cellule HEK293 è massima (~50%) utilizzando sgRNA1+ABE8e+SpCas9, mentre dalla figura 3B si evince che meno del 5% di adenine in posizione c.844 sono convertite in guanine, sfruttando gli stessi componenti di editing.



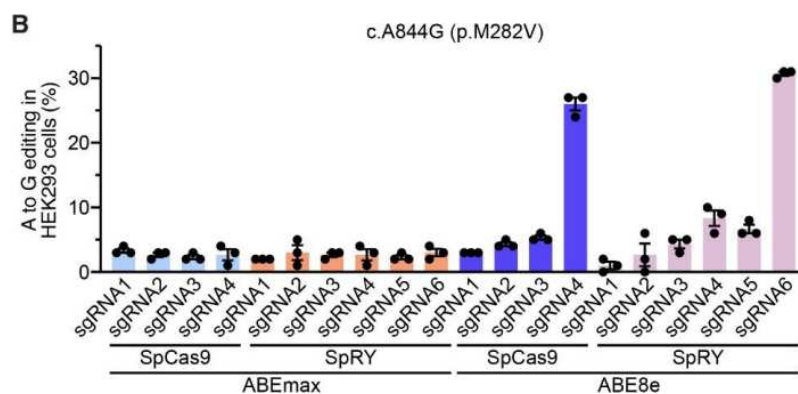


Figura 3: Percentuale di A in posizione c.841 e c.844 convertite in G nelle cellule HEK293 per i sgRNAs da 1 a 6 combinati con ABEmax o ABE8e fusi con SpCas9 o SpRY

Il sgRNA6 abbinato a ABE8e e SpRY mostra invece un'azione più ad ampio spettro: questo sistema di editing modifica sia l'adenina c.841 sia l'adenina c.844 ma anche l'adenina c.848 che fa parte del codone codificante per l'istidina 283.

I due sistemi di editing appena descritti sono stati testati anche nelle iPSCs in seguito a nucleofezione ed è stato ottenuto lo stesso pattern di modifica osservato nelle cellule HEK293.

Il sequenziamento Sanger è stato utilizzato anche per verificare se esponendo diversi cloni di iPSC a sgRNA6+ABE8e-SpRY risultassero genotipi omozigoti o eterozigoti. Come dimostra la figura 4, il 75, il 17 e l'8% dei cloni sono risultati rispettivamente omozigoti, eterozigoti e wild-type.

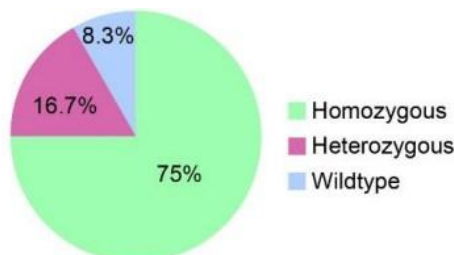


Figura 4: Percentuale di cloni iPSC che sono wild-type, eterozigoti o omozigoti per le adenine c.841, c.844 e c.848

#### 4.2 Analisi di western blot in cardiomiociti derivati da iPSCs

In seguito a IR, i cardiomiociti wild-type (WT iPSC-CMs) hanno mostrato un aumento dell'ossidazione di CaMKII mentre l'ossidazione di CaMKII è stata fortemente ridotta in sgRNA1 iPSC-CMs e in sgRNA6 iPSC-CMs. In figura 5A si osserva infatti che l'intensità della banda relativa alla forma ossidata di CaMKII è nettamente maggiore nei cardiomiociti wild-type che hanno subito IR rispetto ai sgRNA1 iPSC-CMs e ai sgRNA6 iPSC-CMs. Ciò viene confermato anche dall'analisi densitometrica dove si osserva che il rapporto tra forma ossidata e non ossidata di CaMKII è mediamente intorno 1,25 nei WT iPSC-CMs sottoposti a IR e invece inferiore a 0,25 in tutti gli altri campioni (fig. 5B).

Inoltre, nei WT iPSC-CMs si osserva anche un aumento significativo dell'auto-fosforilazione di CaMKII. Lo stress ossidativo provocato dall'IR ha infatti attivato dei monomeri di CaMKII nei WT iPSC-CMs e ciò ha indotto l'auto-fosforilazione dei domini regolatori dei monomeri adiacenti. Al contrario, nei sgRNA1 iPSC-CMs e nei sgRNA6 iPSC-CMs l'attivazione di CaMKII è stata impedita dalla rimozione delle metionine sensibili all'ossidazione dunque le bande relative alla CaMKII auto-fosforilata sono visibilmente ridotte.

Tramite western blot è stata anche analizzata la quantità totale della proteina CaMKII per verificare che non ci fossero differenze tra i WT iPSC-CMs e gli iPSC-CM sottoposti a editing. Infine è stata quantificata anche la proteina GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) affinché potesse essere utilizzata come proteina housekeeping.

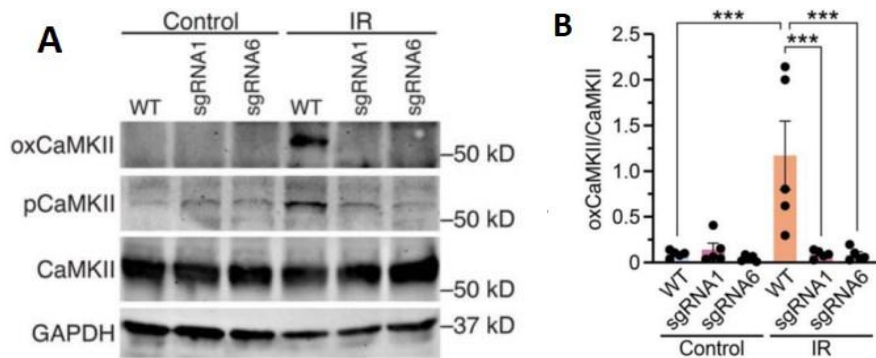


Figura 5: (A) Western blot di CaMKII ossidata, CaMKII auto-fosforilata, CaMKII totale e GAPDH in WT, sgRNA1 e sgRNA6 iPSC-CMs. (B) Analisi densitometrica di CaMKII ossidata normalizzata a CaMKII totale in iPSC-CMs di controllo e post-IR

Essendo CaMKII maggiormente attivata nei WT iPSC-CMs, ci si attende un aumento della quantità di proteine bersaglio fosforilate in queste cellule. L'analisi densitometrica, che traduce in numero l'intensità delle bande di western blot, dimostra infatti che la quantità di recettori cardiaci della rianodina fosforilati (pRyR2) è superiore nei WT iPSC-CMs rispetto agli iPSC-CMs sottoposti a editing (fig. 6).

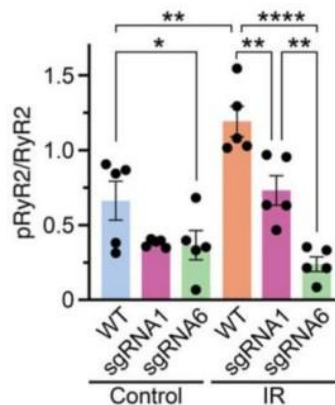


Figura 6: Analisi densitometrica di pRyR2 normalizzata a RyR2 totale in iPSC-CMs di controllo e post-IR



### 4.3 Analisi della funzione cardiaca post-IR nei topi

Una settimana prima dell'IR, tutti i topi sono stati sottoposti a ecocardiografia e tutti esibivano normale funzione cardiaca e simili frazioni di accorciamento, come dimostra la figura 7. La frazione di accorciamento è la più semplice misura di funzione sistolica del ventricolo sinistro e consiste nella variazione percentuale delle dimensioni dell'asse minore del ventricolo sinistro in sistole rispetto alla sua dimensione in diastole.

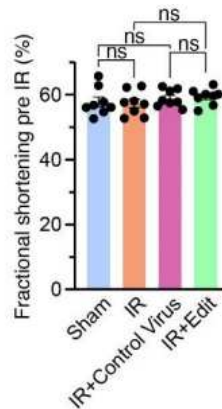


Figura 7: Frazione di accorciamento media pre-IR in topi trattati per finta, in topi sottoposti a IR senza iniezione, con iniezione del virus di controllo e con iniezione di AAV-ABE-sgRNA6

Ripetendo l'elettrocardiografia 24 ore dopo l'IR, si nota che la frazione di accorciamento è diminuita in misura simile in tutti i gruppi, ad eccezione nei topi sottoposti a finta operazione (fig. 8). Questi valori rimangono stabili per la prima settimana dopo l'IR.

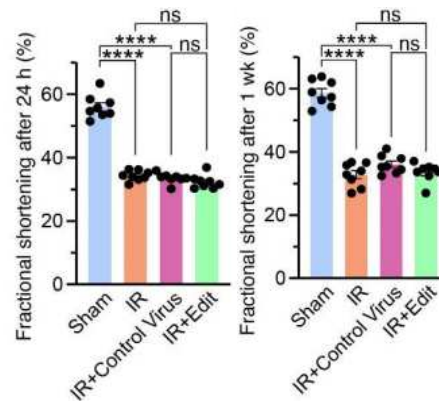


Figura 8: Frazione di accorciamento media 24 ore post-IR e 1 settimana post-IR in topi trattati per finta, in topi sottoposti a IR senza iniezione, con iniezione del virus di controllo e con iniezione di AAV-ABE-sgRNA6

Dopo due settimane dall'IR, i topi a cui era stato somministrato AAV-ABE-sgRNA6 hanno iniziato a riprendersi, come dimostra l'aumento della frazione di accorciamento media rispetto ai topi sottoposti a IR senza iniezione e con iniezione del virus di controllo (fig. 9B). L'intervallo temporale che intercorre tra la somministrazione dei componenti ABE e l'inizio del recupero dei topi è dovuto al fatto

che l'editing genomico avviene entro la prima settimana dopo l'iniezione. I topi sottoposti a editing hanno mostrato un ulteriore miglioramento della funzione cardiaca 3 settimane dopo l'IR e hanno raggiunto un valore di frazione di accorciamento paragonabile a quello dei topi sottoposti a finta operazione (fig.9A e B).

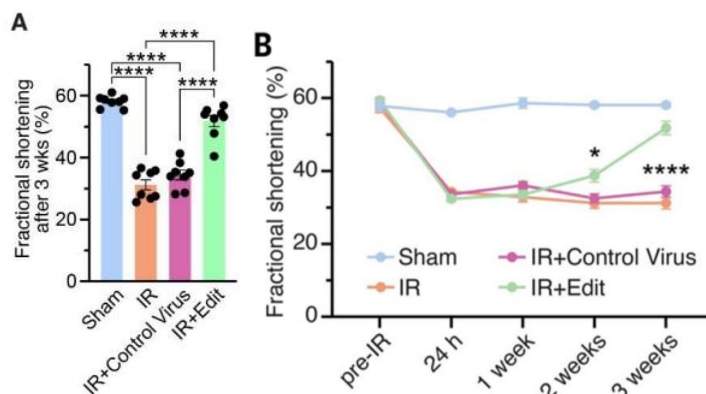


Figura 9: (A) Frazione di accorciamento media 3 settimane post-IR. (B) Decorso temporale della frazione di accorciamento per ciascun gruppo di topi

#### 4.4 Analisi dell'efficienza di editing e del potenziale editing off-target nel tessuto cardiaco murino

Cinque settimane dopo l'IR, nel tessuto cardiaco di ciascun gruppo di topi sono state effettuate le analisi molecolari, tra cui il sequenziamento basato sugli ampliconi. Esso ha rivelato un'efficienza di conversione dell'adenina in guanina del  $7,6 \pm 0,2\%$  in posizione c.841, del  $7,5 \pm 0,2\%$  in posizione c.844 e del  $8,4 \pm 0,2\%$  in posizione c.848 a livello del DNA genomico. A livello del cDNA invece, le adenine sono state convertite in guanine con un'efficienza del  $46,1 \pm 1,1\%$  sia in posizione c.841 che c.844 e del  $46,6 \pm 1,0\%$  in posizione c.848. Questa differenza (fig. 10) si spiega considerando che l'isoforma di CaMKII più espressa nei cardiomiociti è CaMKII $\delta$  dunque il cDNA è rappresentato quasi totalmente dalla retro-trascrizione di questa isoforma. Al contrario, a livello di DNA genomico nel sequenziamento vengono utilizzati primer anche per le altre isoforme di CaMKII (CaMKII $\alpha$ , CaMKII $\beta$  e CaMKII $\gamma$ ) che non sono soggette a editing.

In figura 10 l'adenina 17 relativa al sgRNA6 corrisponde all'adenina in posizione c.841, l'adenina 14 corrisponde all'adenina in posizione c.844 mentre l'adenina 10 coincide con l'adenina in posizione c.848.

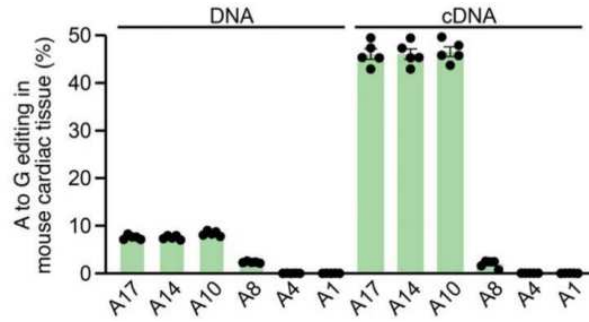


Figura 10: Percentuale di A convertite in G a livello di DNA e cDNA per ogni adenina lungo sgRNA6 nel miocardio di topi iniettati con AAV-ABE-sgRNA6

In particolare, a livello di cDNA l'efficienza di editing risulta molto più elevata nella parete cardiaca anteriore ( $82,7 \pm 1,2\%$  in posizione c.841,  $85,7 \pm 0,7\%$  in posizione c.844 e  $85,8 \pm 1,2\%$  in posizione c.848) rispetto che nella parete inferiore, come mostrato in figura 11. Ciò si verifica perché l'iniezione è avvenuta nella parete cardiaca anteriore dunque le adenine sono state modificate quasi esclusivamente nei cardiomiociti di quest'area.

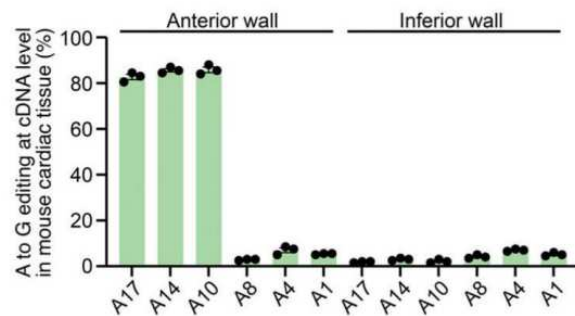


Figura 11: Percentuale di A convertite in G a livello di cDNA nella parete cardiaca anteriore e inferiore di topi iniettati con AAV-ABE-sgRNA6

Nonostante la proteina CaMKII sia espressa in molti tessuti, l'editing genomico non è avvenuto in modo consistente per nessuna isoforma di CaMKII nel cervello, nel muscolo tibiale anteriore e nel fegato (fig. 12). Ciò era previsto avendo utilizzato il promotore cardiaco-specifico cTnT per guidare l'espressione di ABE.

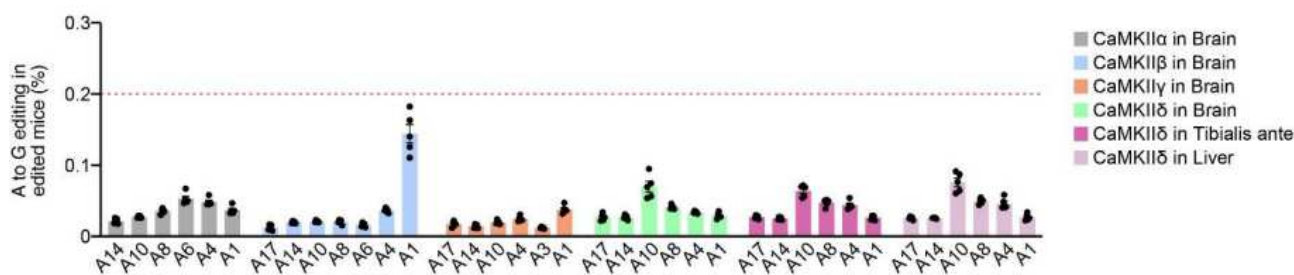


Figura 12: Percentuale di A convertite in G per ogni adenina nella sequenza di DNA corrispondente al sgRNA6 nel cervello, nel muscolo tibiale anteriore e nel fegato di topi iniettati con AAV-ABE-sgRNA6

Tra le analisi molecolari svolte nel tessuto cardiaco di ciascun gruppo di topi c'è anche il western blot. Esso ha dimostrato che la quantità di CaMKII ossidata è aumentata di

4,4 volte nei topi di controllo post-IR rispetto ai topi sottoposti a editing (fig. 13A). Nell'analisi densitometrica la forma ossidata di CaMKII è stata normalizzata a CaMKII totale.

La lieve rilevazione di CaMKII ossidata nei topi iniettati con AAV-ABE-sgRNA6 può derivare dalla presenza dell'isoforma CaMKII $\delta$  non modificata e ossidata, dalla presenza dell'isoforma CaMKII $\gamma$  ossidata o dal rumore di fondo aspecifico.

Conseguentemente all'aumento della quantità di CaMKII ossidata, è aumentata anche l'auto-fosforilazione di CaMKII nei topi di controllo post-IR ma non nei topi sottoposti a editing (fig. 13B). Infine, anche la fosforilazione di RyR2 CaMKII-dipendente è aumentata solo nei topi di controllo post-IR (fig. 13C).

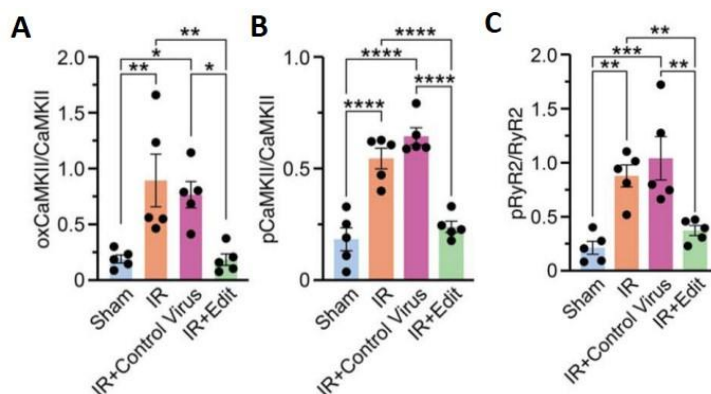


Figura 13: (A) Analisi densitometrica di CaMKII ossidata normalizzata a CaMKII totale per ciascun gruppo di topi. (B) Analisi densitometrica di pCaMKII normalizzata a CaMKII totale per ciascun gruppo di topi. (C) Analisi densitometrica di pRyR2 normalizzata a RyR2 totale per ciascun gruppo di topi

#### 4.5 Analisi del trascrittoma cardiaco post-IR tramite RNA sequencing

L'RNA sequencing nel tessuto cardiaco dei topi di controllo e dei topi sottoposti a editing ha rivelato tre differenti tipi di trascrittomi, come si osserva nel grafico di "Principal Component Analysis" (PCA) in figura 14A. Si tratta di un metodo per rappresentare le differenze più macroscopiche tra vari campioni biologici: campioni con profilo di espressione simile dovrebbero clusterizzare assieme. In quest'analisi non sono state rilevate differenze tra i due diversi gruppi di controllo sottoposti a IR (IR e IR+Control virus). Al contrario, il tessuto cardiaco sottoposto a IR e all'editing di CaMKII $\delta$  presenta un trascrittoma diverso sia dai topi sottoposti a finta operazione sia dai topi di controllo sottoposti a IR.

Per visualizzare graficamente i profili di espressione di due condizioni sperimentali simultaneamente è stata sfruttata la "heat map" (fig. 14B). In totale, sono stati identificati 211 geni che sono differenzialmente espressi nei topi sottoposti a IR e all'iniezione con AAV9 di controllo e nei topi sottoposti a finta operazione.

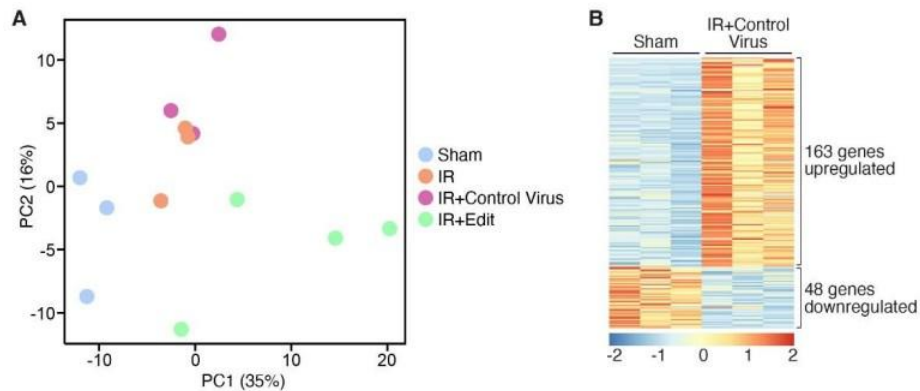


Figura 14: (A) Principal component analysis (PCA) del trascrittoma cardiaco nei 4 campioni. (B) Heat map dei geni differenzialmente espressi tra i topi trattati per finta e i topi sottoposti a IR+Control virus

Le analisi di Gene Ontology dei 163 geni up-regolati nei topi sottoposti a IR+Control virus ha rivelato pathways associati a malattie cardiache (fig. 15A) mentre i pathways associati ai 48 geni down-regolati sono principalmente connessi alla funzione cardiaca (fig. 15B).

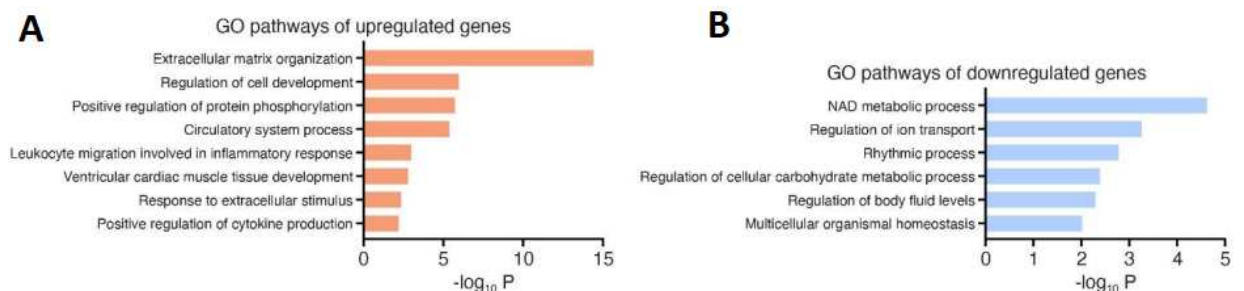


Figura 15: (A) Gene ontology dei 163 geni up-regolati nei topi sottoposti a IR+Control virus. (B) Gene ontology dei 48 geni down-regolati nei topi sottoposti a IR+Control virus

Rispetto ai topi trattati con il virus di controllo, sono stati trovati 101 geni up-regolati e 108 geni down-regolati nei topi sottoposti a editing di CaMKII $\delta$ , come si vede nella heat map in figura 16A. Le analisi di Gene Ontology hanno rivelato che i pathways associati alle malattie cardiache, che erano disregolati nei topi sottoposti a IR+Control virus, sono stati recuperati nei topi soggetti a editing (fig. 16B e C). Ad esempio, i geni coinvolti nella regolazione del trasporto di ioni sono down-regolati nei topi sottoposti a IR+Control virus mentre sono up-regolati nei topi sottoposti a editing. La sotto-regolazione di questo pathway nei topi di controllo, alterando la concentrazione intracellulare di ioni come il calcio, potrebbe essere coinvolta nell'insorgenza di malattie cardiache.

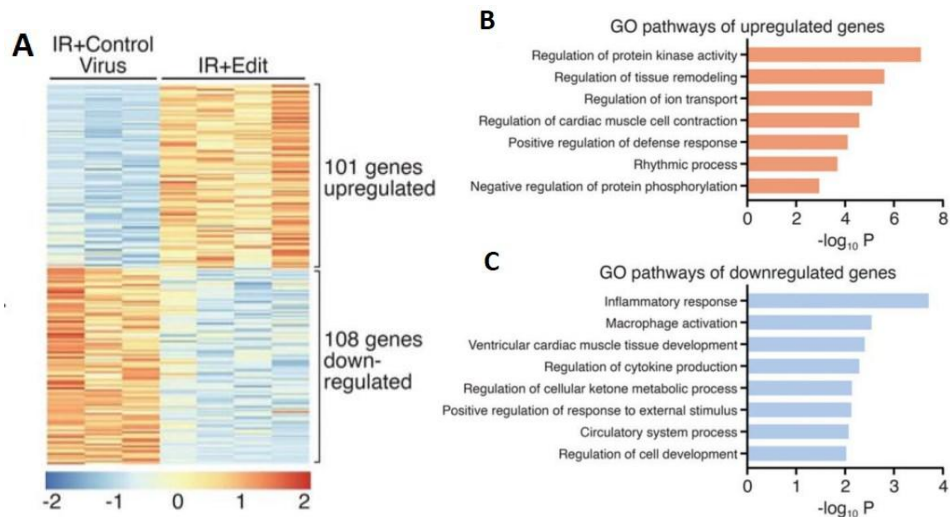
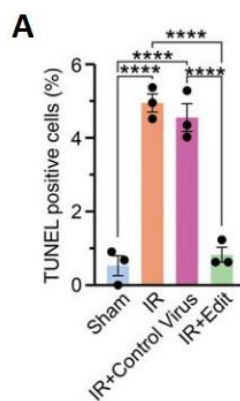


Figura 16: (A) Heat map dei geni differenzialmente espressi tra i topi sottoposti a IR+AAV9 di controllo e i topi sottoposti a IR+Editing. (B) Ontologia genica associata ai 101 geni up-regolati nei topi sottoposti a IR+Editing. (C) Ontologia genica associata ai 108 geni down-regolati nei topi sottoposti a IR+Editing

#### 4.6 Valutazione degli eventi di morte cellulare e fibrosi post-IR tramite analisi istologiche

Il saggio TUNEL effettuato sulle sezioni cardiache di topo ha evidenziato una percentuale di cellule apoptotiche considerevolmente maggiore nei topi di controllo post-IR rispetto ai topi sottoposti a finta operazione (fig. 17A). In figura 17B si nota infatti un maggior numero di cellule colorate di verde e indicate da una freccia nelle sezioni di topi IR e IR+Control virus. Inoltre, nei topi sottoposti a editing le cellule positive alla colorazione TUNEL sono quantitativamente comparabili ai topi fintamente trattati. La colorazione Hoechst è stata utilizzata per identificare i nuclei delle cellule che appaiono per questo di colore blu. Infine l'immunoistochimica per la troponina è stata effettuata per visualizzare il muscolo cardiaco e l'organizzazione del tessuto.



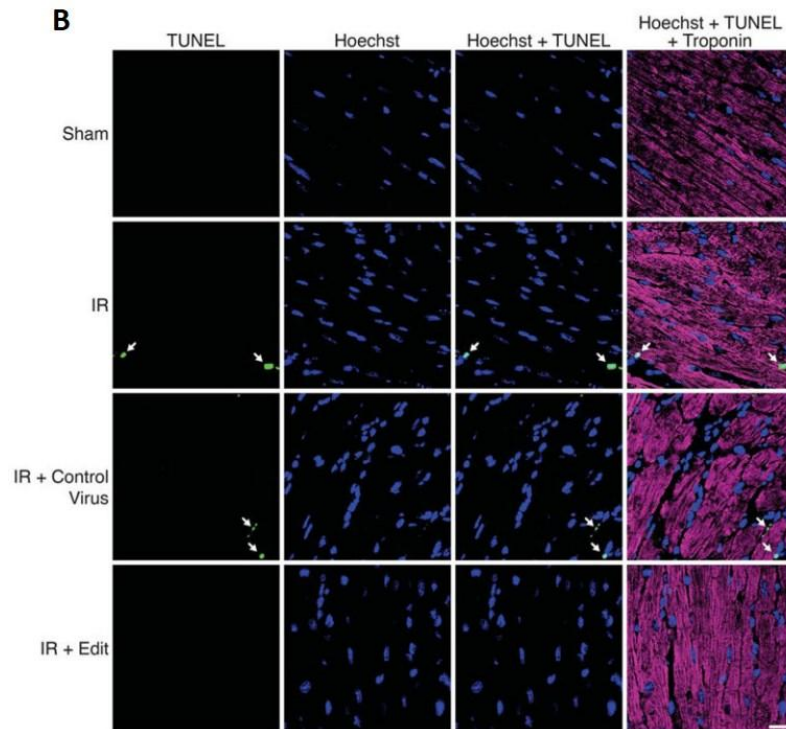
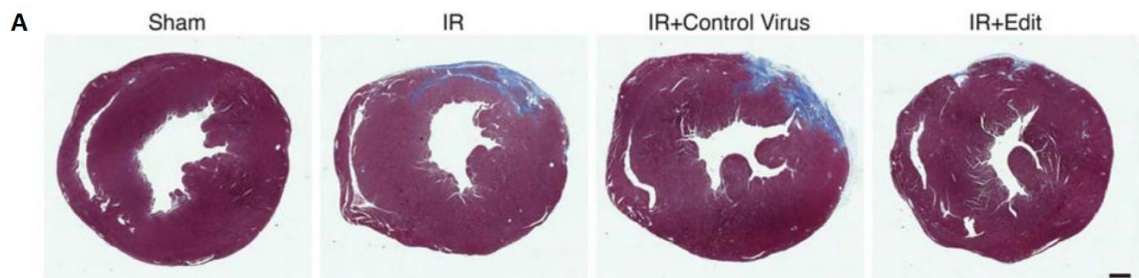


Figura 17: (A) Percentuale media di cellule positive alla colorazione TUNEL in ciascun gruppo di topi (B) Colorazione TUNEL, Hoechst e immunostochimica per la troponina cardiaca delle sezioni di cuore di topi sottoposti a finta operazione, a IR, a IR+Control virus e a editing genomico.

La colorazione tricromica, utilizzata per quantificare il tessuto fibroso, ha dimostrato che l'area occupata dal tessuto fibroso è 2,7 volte maggiore nei topi di controllo post-IR rispetto ai topi sottoposti a editing (fig. 18A). Le sezioni trasversali del cuore dei topi di controllo (IR e IR+Control virus) mostrano infatti delle notevoli porzioni di tessuto colorate di blu che stanno ad indicare le fibre collagene, componenti principali del tessuto fibroso (fig. 18B). Infatti, nel cuore dei topi di controllo le lesioni provocate dall'ischemia/riperfusione hanno indotto i fibroblasti cardiaci a depositare tra un cardiomiocita e l'altro proteine della matrice extracellulare, come il collagene. Questo processo è definito fibrosi cardiaca ed è responsabile dell'irrigidimento del tessuto cardiaco (Liu et al., 2021). L'editing di CaMKII $\delta$  ha invece fornito ai topi trattati protezione dalla fibrosi post-IR: le sezioni del cuore di questi topi infatti appaiono quasi esclusivamente di colore rosso ossia caratterizzate da fibre muscolari.



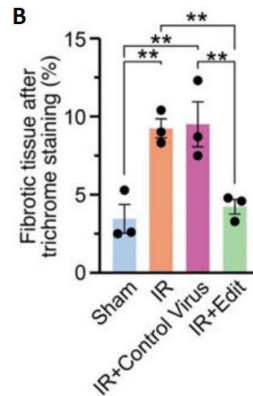


Figura 18: (A) Sezioni trasversali di cuori sottoposti a colorazione tricromica per ogni gruppo di topi. (B) Percentuale media di tessuto cardiaco fibroso per ogni gruppo di topi

Infine, i topi sono stati analizzati 260 giorni dopo l'iniezione con AAV-ABE-sgRNA6 e non hanno dimostrato nessuna differenza con i topi wild-type in termini di peso corporeo e di prestazione fisica in seguito a test di esaurimento su tapis-roulant.

## 5. Discussione e conclusioni

L'obiettivo di questa sperimentazione era quello di usare CRISPR-Cas9 per interrompere una via di segnalazione patologica, proponendo un potenziale approccio terapeutico per le malattie cardiache. Inizialmente sono stati sperimentati diversi approcci di editing nelle cellule HEK293. I due sgRNAs più efficienti sono stati poi testati in cardiomiociti umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). Infine è stato applicato il sistema CRISPR-Cas9 con il miglior effetto terapeutico in vitro, in topi adulti sottoposti a ischemia/riperfusion (IR).

La proteina CaMKII $\delta$  era già stata riconosciuta in passato come regolatore principale dei pathways coinvolti nel rimodellamento cardiaco e nelle aritmie. La terapia allora proposta si basava sull'inibizione di CaMKII $\delta$  tramite inibitori competitivi con l'ATP, con il substrato o tramite siRNA in grado di degradare l'mRNA di CaMKII $\delta$ . Questo approccio però aveva numerose limitazioni tra cui l'inibizione di bersagli off-target (canali del potassio e altre chinasi), una sconosciuta biodisponibilità nella somministrazione in vivo, una scarsa permeazione cellulare e spesso apportava pochi benefici terapeutici. Inoltre, trattandosi di un'inibizione di tipo globale ed essendo CaMKII $\delta$  ubiquitariamente espressa, la terapia poteva avere effetti anche deleteri nei tessuti diversi dal cuore. Infine gli inibitori di CaMKII $\delta$  necessitavano di essere somministrati giornalmente. L'editing genetico di CaMKII $\delta$  proposto in questa sperimentazione supera numerose di queste limitazioni: è permanente e non comporta effetti collaterali in altri tessuti perché il sistema ABE viene espresso solo nel cuore grazie all'utilizzo del promotore cardiaco cTnT.



In questo studio sono stati analizzati gli otto siti di potenziale editing off-target nel genoma umano e tutti hanno mostrato una percentuale di conversione di A in G molto bassa (<0.2%), ad eccezione del gene DAZL in cui però il sito modificato era localizzato in una regione intronica. Nonostante quest'analisi, sarebbero necessari studi più approfonditi per la somministrazione in vivo su pazienti di questi editor di geni. Ad esempio dovrebbero essere approfondite le conseguenze funzionali dell'editing dell'adenina c.848 che converte l'istidina 283 di CaMKII $\delta$  in arginina. Questa modifica potrebbe avere effetti indesiderati sulla struttura o sull'attività della chinasi che dovrebbero essere presi in considerazione (Walkey et al., 2023).

L'editing off-target può dipendere, oltre che dal sgRNA, anche dall'attività aspecifica del base editor che deriva dalle interazioni transienti tra la deaminasi e il DNA o l'RNA. Nonostante queste interazioni siano ritenute casuali e siano meno frequenti utilizzando ABE rispetto a CBE (cytosine base editor), esse destano comunque una certa preoccupazione (Walkey et al., 2023).

Per garantire l'efficienza di questa terapia, è necessario prendere in considerazione la risposta immunitaria dei pazienti a tutti i componenti esogeni del sistema CRISPR-Cas9. Un'immunità preesistente contro il capsido dei vettori AAV o contro la proteina Cas9 di *Streptococcus pyogenes* (componente di ABE) potrebbe infatti indurre i linfociti T citotossici a distruggere le fibre muscolari sottoposte a editing. In particolare, in uno studio recente è stato stimato che il 58%-78% degli esseri umani ha anticorpi anti-Cas9 nel siero: essi potrebbero portare ad una rapida degradazione delle proteine Cas9 impedendogli di svolgere le modifiche del genoma desiderate. Questo problema potrebbe essere risolto fornendo ai cardiomiociti il sistema ABE sotto forma di mRNA o di particella ribonucleoproteica, caratterizzati da un'emivita all'interno della cellula più breve rispetto ai vettori virali (Walkey et al., 2023).

Un ulteriore interrogativo che sorge dall'analisi di questo lavoro riguarda la finestra temporale che intercorre tra le lesioni da IR e l'intervento di editing. In topo i vettori AAV sono stati somministrati esattamente al momento dell'IR ma non è stato dimostrato se l'editing funzioni ancora in caso di somministrazione ore o giorni dopo l'IR (Walkey et al., 2023).

Affinchè questo approccio clinico possa essere utilizzato come terapia in pazienti affetti da malattie cardiache, esso dovrà superare i trial clinici che ne verificheranno l'efficacia e la sicurezza. In questa fase, la sperimentazione potrà avvalersi di un gruppo di partecipanti agli studi clinici potenzialmente molto ampio dal momento che non si tratta di una malattia genetica rara ma di una delle principali cause di mortalità nel mondo (Walkey et al., 2023). Se infine questa terapia venisse approvata, la somministrazione dei componenti per l'editing di CaMKII $\delta$  nei pazienti colpiti da

infarto miocardico dovrebbe essere comunque combinata con le attuali cure fornite in seguito ad un attacco di cuore. Esse consistono nell'angiografia coronarica, che permette di analizzare in tempo reale il flusso di sangue all'interno delle coronarie, e nella rivascolarizzazione dell'arteria ostruita. Queste due tecniche, per raggiungere il vaso occluso, richiedono un catetere che può essere dunque utilizzato anche per fornire i componenti di editing all'area infartuata.

## 6. Bibliografia

Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Research in Cardiology*, 2018; 113:29.

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 2008; 133:462-74.

Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biology*, 2013; 10:841-51.

Liang F, Zhang Y, Li L, Yang Y, Fei JF, Liu Y, Qin W. SpG and SpRY variants expand the CRISPR toolbox for genome editing in zebrafish. *Nature Communications*, 2022; 13:3421.

Liu N, Olson EN. CRISPR Modeling and Correction of Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 2022; 130:1827-1850.

Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021; 173:504-519.

Rusciano MR. Ruolo della chinasi Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina- dipendente di tipo II (CaMKII) nella cascata enzimatica delle MAPK e nei tumori tiroidei. 2010; Dottorato di Ricerca in Biologia Avanzata, Università degli Studi di Napoli.

Rusciano MR, Sommariva E, Douin-Echinard V, Ciccarelli M, Poggio P, Maione AS. CaMKII Activity in the Inflammatory Response of Cardiac Diseases. *International Journal of Molecular Science*, 2019; 20:4374.

Walkey CJ, Lagor WR. CaMKII $\delta$  gene editing- A base hit for the heart. *Journal of Cardiovascular Aging*, 2023; 3:19.

Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018; 46:1650-1667.

Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, 2021; 11:614-648.

Zhang T, Kohlhaas M, Backs J, Mishra S, Phillips W, Dybkova N, Chang S, Ling H, Bers DM, Maier LS, Olson EN, Brown JH. CaMKII $\delta$  isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282:35078-87

## GENE EDITING

# Ablation of CaMKII $\delta$ oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease

Simon Lebek<sup>1,2,3</sup>, Francesco Chemello<sup>1,2</sup>, Xurde M. Caravia<sup>1,2</sup>, Wei Tan<sup>1,2</sup>, Hui Li<sup>1,2</sup>, Kenian Chen<sup>4</sup>, Lin Xu<sup>4</sup>, Ning Liu<sup>1,2</sup>, Rhonda Bassel-Duby<sup>1,2</sup>, Eric N. Olson<sup>1,2\*</sup>

CRISPR-Cas9 gene editing is emerging as a prospective therapy for genomic mutations. However, current editing approaches are directed primarily toward relatively small cohorts of patients with specific mutations. Here, we describe a cardioprotective strategy potentially applicable to a broad range of patients with heart disease. We used base editing to ablate the oxidative activation sites of CaMKII $\delta$ , a primary driver of cardiac disease. We show in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells that editing the *CaMKII $\delta$*  gene to eliminate oxidation-sensitive methionine residues confers protection from ischemia/reperfusion (IR) injury. Moreover, *CaMKII $\delta$*  editing in mice at the time of IR enables the heart to recover function from otherwise severe damage. *CaMKII $\delta$*  gene editing may thus represent a permanent and advanced strategy for heart disease therapy.

CRISPR-Cas9 gene editing is being developed as a therapeutic approach to correct monogenic mutations causing hereditary diseases (1–6). However, most CRISPR-Cas9 editing strategies are focused on correction of specific genetic mutations that occur in a small subset of patients, limiting broader applications of the approach. We sought to design a CRISPR-Cas9 gene editing therapy potentially applicable to a broad range of adult patients with cardiovascular disease, the leading cause of worldwide morbidity and mortality (7). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) is a central regulator of cardiac signaling and function (8). However, chronic overactivation of CaMKII $\delta$  causes several cardiac diseases in humans and mice, including ischemia/reperfusion (IR) injury, heart failure, hypertrophy, and arrhythmias (9–16). Mechanistically, CaMKII $\delta$  overactivation in the heart has been linked to disturbances in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, inflammation, apoptosis, and fibrosis, leading to cardiac dysfunction (9–13, 17). Oxidation of two methionine residues, Met281 and Met282, located in the regulatory domain of CaMKII $\delta$ , promotes hyperactivation of the kinase by preventing association of the catalytic domain with the autoinhibitory region (18). Modification of these methionine residues to other amino acids prevents oxidation and overactivation of CaMKII $\delta$ , thereby conferring cardioprotection as shown in knock-in mice, where both methionine residues were replaced with valines

in the germline (14, 18, 19). This genetic modification did not cause adverse effects. Both methionines are encoded by exon 11, which is not subject to alternative splicing, so targeting the oxidative activation sites would affect all CaMKII $\delta$  splicing variants (for example CaMKII $\delta$ <sub>B</sub>,  $\delta$ <sub>C</sub>, and  $\delta$ <sub>9</sub> as the major cardiac variants) (20).

## Results

### Design of a gene editing strategy to ablate the oxidative activation sites of CaMKII $\delta$

CRISPR-Cas9 adenine base editing (ABE) allows the precise conversion of adenine nucleotides without introducing double-stranded DNA breaks (1, 2, 21–23). We reasoned that ABE could potentially render CaMKII $\delta$  insensitive to oxidative activation by converting ATG to GTG codons and thereby replacing the oxidation-sensitive methionines with valines (Fig. 1A). Instead of using CRISPR-Cas9 technology to correct genetic mutations, we used the technology to disrupt a pathological signaling pathway, offering a potential therapeutic approach for cardiac disease.

To identify optimal CRISPR-Cas9 base editing components, we used HEK293 cells to screen six different single guide RNAs (sgRNAs; table S1) that covered the genomic region encoding methionines 281 (adenine at nucleotide position c.841) and 282 (adenine at nucleotide position c.844). The sgRNAs were tested with two adenine base editors, ABE<sub>max</sub> and ABE<sub>8e</sub>, in which the engineered deaminases were fused to either SpCas9 nickase or its variant SpRY nickase (3, 23, 24). Sanger sequencing revealed that sgRNA1 combined with ABE<sub>8e</sub>-SpCas9 had the highest efficiency for editing c.A841G (p.M281V), without editing c.A844 (p.M282). sgRNA6 combined with ABE<sub>8e</sub>-SpRY showed a broader editing window, editing c.A841G (p.M281V), c.A844G (p.M282V), and c.A848G (p.H283R; fig. S1 and table S2). We validated the sgRNA1 + ABE<sub>8e</sub>-SpCas9 and sgRNA6 +

ABE<sub>8e</sub>-SpRY editing strategies in human induced pluripotent stem cells (iPSCs) using nucleofection and observed the same editing pattern seen in HEK293 cells (Fig. 1, B to D). We picked several iPSC clones to test whether exposure to sgRNA6 + ABE<sub>8e</sub>-SpRY resulted in a heterozygous or homozygous genotype. Sanger sequencing revealed that 75, 17, and 8% of the clones were homozygous, heterozygous, and wildtype, respectively (fig. S2A).

### Analysis of potential off-target editing in human iPSCs

The two oxidation-sensitive methionines of human CaMKII $\delta$  are encoded by exon 11 of the *CaMKII $\delta$*  gene, which shares 79% nucleotide homology with *CaMKII $\alpha$*  and 76% nucleotide homology with *CaMKII $\gamma$* . The sgRNA6 sequence shared 85% homology with *CaMKII $\alpha$*  and *CaMKII $\gamma$*  (fig. S2B). We used deep amplicon sequencing to validate the specificity of ABE genomic editing of *CaMKII $\delta$*  with sgRNA6 + ABE<sub>8e</sub>-SpRY. In human iPSCs, we observed no genomic changes of the *CaMKII $\alpha$*  or *CaMKII $\gamma$*  genes (fig. S2, C and D, and table S3). However, sgRNA6 has sequence identity with the human *CaMKII $\beta$*  gene, and sequencing analysis showed that the human *CaMKII $\beta$*  gene was edited by sgRNA6. Fortunately, CaMKII $\beta$  is not expressed in human cardiomyocytes, so genomic editing of the *CaMKII $\beta$*  gene in the heart would be inconsequential (fig. S2, E and F) (12). To assess off-target editing, we used CRISPOR to identify the top eight potential off-target sites (table S4) (25). Sequencing analysis showed adenine to guanine editing only in the *DAZZL* gene at the adenine base 13 nucleotides upstream from the protospacer adjacent motif (PAM; fig. S2G and tables S4 and S5). This edited site is located in an intronic region that is not expressed and therefore should not have deleterious consequences (25). All other adenines of the predicted top eight potential off-target sites showed adenine to guanine editing of <0.2%, which is considered unspecific background (26).

### Functional analyses of CaMKII $\delta$ -edited human iPSC-derived cardiomyocytes

To investigate the physiological consequences of both editing patterns, we generated three independent human homozygous iPSC lines with sgRNA1, sgRNA6, or no sgRNA (wildtype) and differentiated them into cardiomyocytes (iPSC-CMs) that were subjected to simulated IR injury using a hypoxia chamber. There was no difference in the amounts of CaMKII protein in wild-type (WT) or edited iPSC-CMs (fig. S3). After IR, WT iPSC-CMs showed an increase in CaMKII oxidation, as measured by Western blot with an antibody that specifically recognizes oxidized CaMKII, whereas CaMKII oxidation was strongly reduced in sgRNA1 iPSC-CMs and sgRNA6 iPSC-CMs (Fig. 1, E

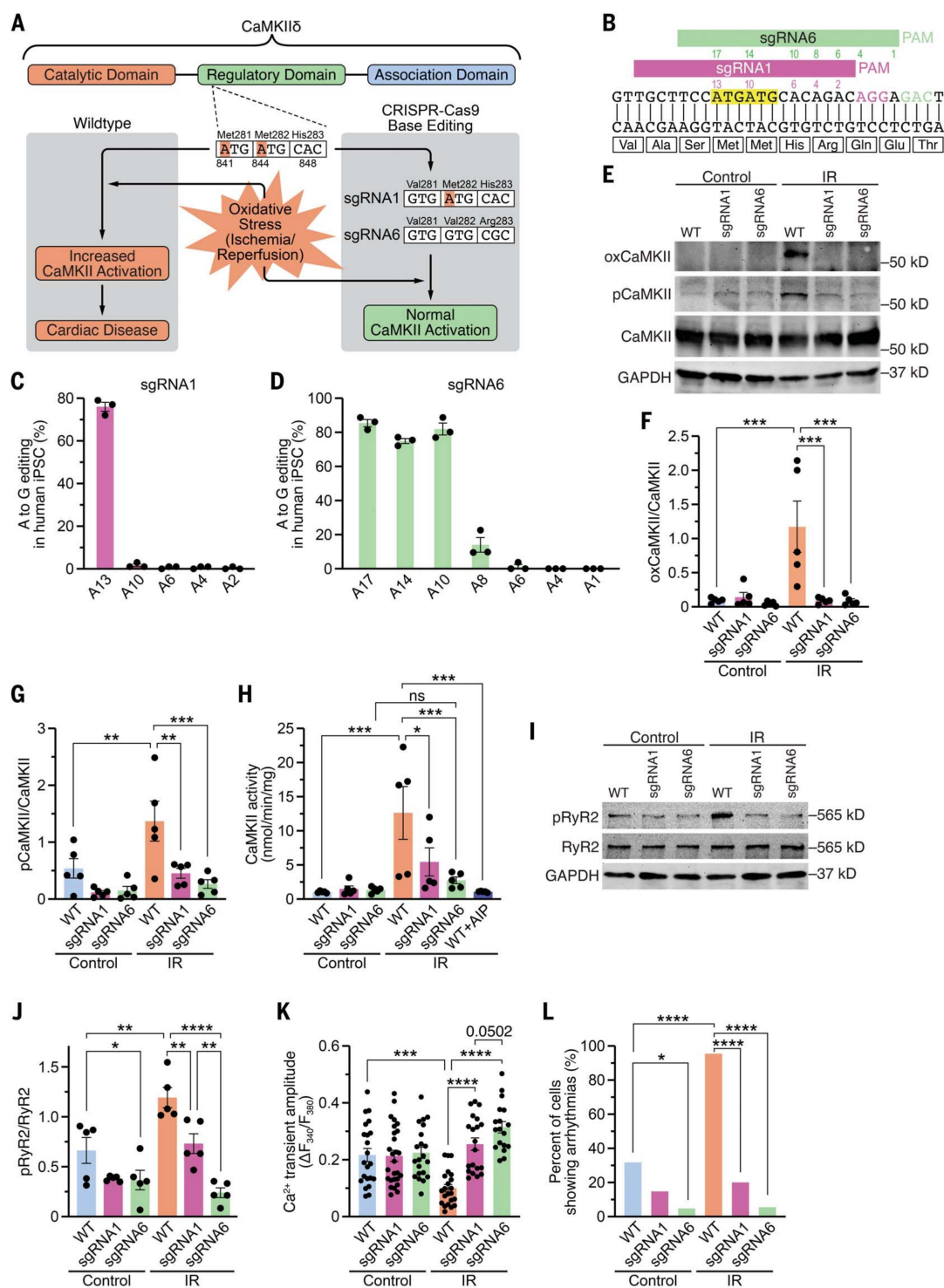
<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA.

<sup>2</sup>Hamon Center for Regenerative Science and Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA. <sup>3</sup>Department of Internal Medicine II, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany.

<sup>4</sup>Quantitative Biomedical Research Center, Department of Population and Data Sciences, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA.

\*Corresponding author. Email: eric.olson@utsouthwestern.edu





**Fig. 1. Genomic editing of *CaMKII $\delta$*  in human iPSC-cardiomyocytes.**

(A) Schematic of CaMKII $\delta$  and its three domains. Both critical methionines (Met281 and Met282) are located in the regulatory domain. Upon oxidative stress, these methionines are oxidized, resulting in increased CaMKII activity and cardiac disease. Using CRISPR-Cas9 adenine base editing, we identified sgRNA1, which edited only c.A841G (p.M281V; sgRNA1), and sgRNA6, which edited c.A841G (p.M281V), c.A844G (p.M282V), and c.A848G (p.H283R; sgRNA6), thereby preventing CaMKII activation upon oxidative stress. (B) Sequence of a segment of exon 11 of *CaMKII $\delta$*  genomic DNA encoding part of the regulatory domain of CaMKII $\delta$ . Alignment of sgRNA1 and sgRNA6 with *CaMKII $\delta$* . PAM

sequences for sgRNA1 and sgRNA6 are in purple and green, respectively. Both ATGs encoding methionines are highlighted in yellow. Adenines within the sequences of sgRNA1 (purple) and sgRNA6 (green) are numbered (starting from the PAM). (C) Percentage of adenine (A) to guanine (G) editing in human iPSCs for each adenine in sgRNA1 after base editing with ABE8e and sgRNA1, as determined by Sanger sequencing. (D) Percentage of adenine (A) to guanine (G) editing in human iPSCs for each adenine in sgRNA6 after base editing with ABE8e and sgRNA6, as determined by deep amplicon sequencing. (E) Western blot analysis of oxidized CaMKII (specific antibody), autophosphorylated CaMKII (specific antibody), total CaMKII, and GAPDH in human WT, sgRNA1, and

sgRNA6 iPSC-CMs for control group and after simulated ischemia/reperfusion (IR). (F) Mean densitometric analysis for oxidized CaMKII normalized to total CaMKII in control and post-IR iPSC-CMs ( $n = 5$  independent iPSC-CM differentiations). (G) Mean densitometric analysis for autophosphorylated CaMKII normalized to total CaMKII in control and post-IR iPSC-CMs ( $n = 5$  independent iPSC-CM differentiations). (H) Scatter bar plot showing mean CaMKII activity in control and post-IR iPSC-CMs and in lysates of WT post-IR iPSC-CMs in presence of the CaMKII inhibitor AIP ( $n = 5$  independent iPSC-CM differentiations). (I) Western blot analysis of ryanodine receptor type 2 (RyR2) phosphorylation at the CaMKII site (serine 2814), total RyR2, and GAPDH

in control and post-IR iPSC-CMs ( $n = 5$  independent iPSC-CM differentiations). (J) Mean densitometric analysis for phosphorylated RyR2 normalized to total RyR2 in control and post-IR iPSC-CMs ( $n = 5$  independent iPSC-CM differentiations). (K) Mean  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude for each group (based on the number of cardiomyocytes). (L) Percentage of iPSC-CMs showing arrhythmias, as measured by epifluorescence microscopy. Statistical comparisons are based on one-way analysis of variance (ANOVA) post-hoc corrected by Holm-Sidak [(F) to (H)] and [(J) and (K)] and on Fisher's exact test (L). Data are presented either as individual data points with means  $\pm$  SEM or as percent of cells (L).

and F, and fig. S3A). WT iPSC-CMs showed substantial increases in CaMKII autophosphorylation and activity post-IR, which were both reduced in sgRNA1- and sgRNA6-edited iPSC-CMs (Fig. 1, E, G, and H). In accordance with the changes in CaMKII activity, we observed increased CaMKII-dependent phosphorylation of ryanodine receptor type 2 (RyR2) at serine 2814 in WT but not in sgRNA1 or sgRNA6 iPSC-CMs post-IR (Fig. 1, I and J, and fig. S3). Function of iPSC-CMs was assessed by measuring cellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients using epifluorescence microscopy. After IR, WT iPSC-CMs showed an increase in diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels, a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude, and arrhythmias (Fig. 1, K and L, and fig. S4). By contrast, iPSC-CMs edited with sgRNA1 and sgRNA6 were protected from deleterious  $\text{Ca}^{2+}$  alterations post-IR.

#### CaMKII $\delta$ editing in mice subjected to IR injury

Since editing with sgRNA6 conferred greater protection to iPSC-CMs than with sgRNA1, we used mouse-sgRNA6 (with 95% homology to human-sgRNA6) and ABE8e-SpRY for base editing to ablate the CaMKII $\delta$  oxidative activation sites in vivo in 12-week-old male C57Bl6 mice (Fig. 2A and fig. S5). We packaged the ABE components in adeno-associated virus serotype-9 (AAV9) using a split-intein trans-splicing system to accommodate the large size of ABE8e and sgRNA6. AAV9 was chosen as the delivery system because it effectively infects the hearts of mice and large mammals (2, 4). To ensure cardiac specificity, we used the cardiac troponin T (cTnT) promoter to drive ABE8e expression. After cardiac IR, AAV9 expressing sgRNA6 and ABE8e-SpRY (AAV-ABE-sgRNA6) was injected [ $7.5 \times 10^{11}$  viral genomes (vg) per kg bodyweight of each component] directly into the area of cardiac injury (Fig. 2A). Control mice were subjected to IR with either an injection of control AAV9 or no injection. Sham-treated mice were also subjected to 45-min open chest surgery. Before IR, all mice exhibited normal cardiac function and similar fractional shortening between groups, as measured by echocardiography (Fig. 2B and fig. S6). As expected, cardiac function decreased 24 hours after IR surgery to a similar extent in all groups (fig. S7). While cardiac function re-

mained stable for the first week (fig. S8), after 2 weeks mice that had been administered AAV-ABE-sgRNA6 began to functionally recover, as assessed by echocardiography (Fig. 2B and fig. S9). This recovery time is consistent with a previous study showing that genomic editing begins within 1 week after AAV9 delivery of CRISPR-Cas9 components in vivo (5). AAV-ABE-sgRNA6-edited mice showed further cardiac improvement 3 weeks post-IR and attained a level of fractional shortening comparable to that of the sham-treated mice (Fig. 2, B and C, and fig. S10). In addition, left ventricular end-diastolic dilation, a hallmark feature of heart failure, was observed after IR in control mice but was not seen post-IR in mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 (Fig. 2D). Furthermore, cardiac magnetic resonance imaging, performed in a subgroup of mice at 4 weeks post-IR, showed impaired cardiac function in control mice and rescue of cardiac function in mice receiving AAV-ABE-sgRNA6 editing components, similar to the echocardiography findings (Fig. 2E, fig. S11, and movies S1 to S4).

#### Analysis of editing efficiency and potential off-target editing after in vivo ABE

Molecular analyses of heart tissue were performed at 5 weeks post-IR. Deep amplicon sequencing of DNA revealed an adenine to guanine editing efficiency of  $7.6 \pm 0.2\%$  (c.A841G, p.M281V),  $7.5 \pm 0.2\%$  (c.A844G, p.M282V), and  $8.4 \pm 0.2\%$  (c.A848G, p.H283R) of the genomic DNA, and  $46.1 \pm 1.1\%$  (c.A841G, p.M281V),  $46.1 \pm 1.1\%$  (c.A844G, p.M282V), and  $46.6 \pm 1.0\%$  (c.A848G, p.H283R) at the cDNA level (Fig. 3A and table S3). This difference can be explained because most cardiac CaMKII $\delta$  is expressed in cardiomyocytes (27), which is the only cell type targeted by a troponin T-driven editing system. Notably, we detected a much higher editing efficiency at the anterior wall with  $82.7 \pm 1.2\%$  (c.A841G, p.M281V),  $85.7 \pm 0.7\%$  (c.A844G, p.M282V), and  $85.8 \pm 1.2\%$  (c.A848G, p.H283R) at the cDNA level (Fig. 3B and C). This indicates that both critical methionines were ablated in almost all cardiomyocytes in the injured area of the heart. No off-target editing of the other CaMKII isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) was seen in the hearts of mice injected with AAV-ABE-sgRNA6, as determined by deep amplicon sequencing

(fig. S12, A and B, and table S3). As expected, mouse hearts injected with control AAV9 showed no genomic editing in the CaMKII $\delta$  gene. Since CaMKII is expressed in many different tissues (27), editing CaMKII in organs other than the heart may potentially cause severe adverse effects. Assessment of CaMKII editing in other tissues did not reveal genomic editing of any CaMKII isoforms in the brain, the tibialis anterior muscle, or the liver, validating the cardiac specificity of the cTnT promoter used in our AAV9 editing system (fig. S12). We also detected no increase in transcriptome-wide adenine to inosine editing in post-IR mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 (Fig. 3D).

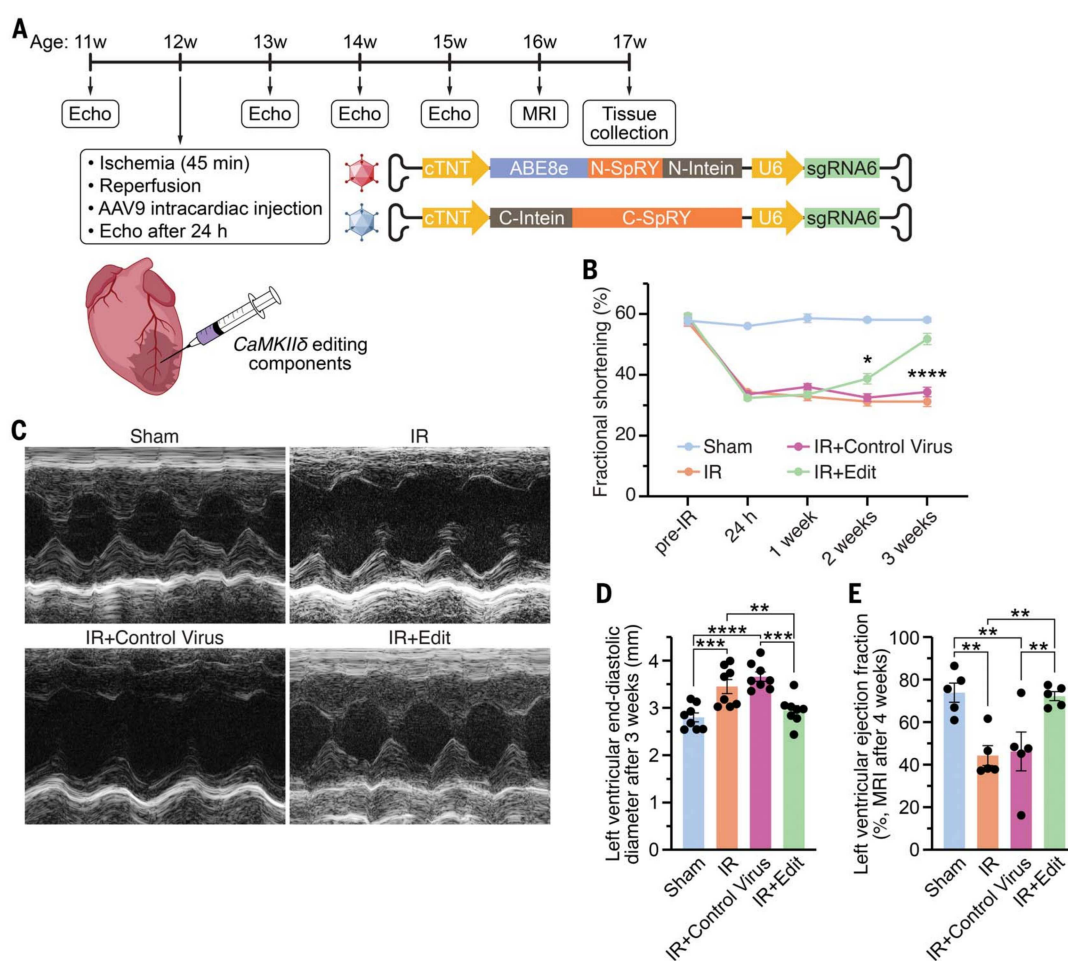
Protein analysis showed a 4.4-fold increase in the amount of oxidized CaMKII in control mice post-IR. The level of oxidized CaMKII post-IR was normalized in the hearts of mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 (Fig. 3, E and F, and fig. S13). The residual signal of oxidized CaMKII in post-IR mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 may either be unedited and oxidized CaMKII $\delta$ , oxidized CaMKII $\gamma$ , or unspecific background. Consistent with the amount of oxidized CaMKII, CaMKII autophosphorylation and activity were increased in control mice post-IR but not in post-IR mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 (Fig. 3, E, G, and H, and fig. S13). Moreover, we found CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 to be increased in control mice post-IR but not in CaMKII $\delta$ -edited mice post-IR (Fig. 3, I and J, and fig. S13).

#### Mechanisms of cardioprotection and long-term effects conferred by CaMKII $\delta$ editing in vivo

RNA sequencing of control and AAV-ABE-sgRNA6-edited hearts revealed three different types of transcriptomes by principal component analysis (fig. S14). Although the transcriptome changed after IR, no differences were detected between the two different control groups post-IR. However, hearts subjected to IR- and CaMKII $\delta$ -editing had a transcriptome different from that of control WT mouse hearts and formed a third cluster. In total, we identified 211 genes that were differentially expressed in mice subjected to IR with injection of control AAV9 compared with sham-treated mice (fig. S14B). Gene ontology analysis of the 163 genes up-regulated

## Fig. 2. *CaMKII $\delta$* base editing improves cardiac function in vivo post-IR.

**(A)** Experimental design for subjecting mice to IR, injecting AAV-ABE-sgRNA6 for *CaMKII $\delta$*  editing in vivo and monitoring heart function by echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging (MRI). The AAV9 delivery system carrying the CRISPR-Cas9 base editing components with a split-intein trans-splicing system is shown. **(B)** Time course of fractional shortening for each group before IR as well as 24 hours, 1 week, 2 weeks, and 3 weeks post-IR ( $n = 8$  mice for each group; x axis not shown to scale). **(C)** Representative M-mode recordings of hearts of a sham-treated mouse, a mouse subjected to IR, a mouse subjected to IR with intracardiac injection of a control virus, and a mouse subjected to IR with intracardiac injection of AAV-ABE-sgRNA6 (IR+Edit) at 3 weeks post-IR. **(D)** Mean left ventricular end-diastolic diameter 3 weeks post-IR ( $n = 8$  mice for each group). **(E)** Mean left ventricular ejection fraction determined by cardiac MRI 4 weeks post-IR ( $n = 5$  mice for each group). All replicates are individual mice. Statistical comparisons are based on two-way (B) and one-way [(D) and (E)] ANOVA post-hoc corrected by Holm-Sidak. Data are presented as means  $\pm$  SEM.



in IR (with control AAV9) revealed pathways related to cardiac disease whereas pathways associated with the 48 down-regulated genes were mainly related to cardiac function (fig. S14, C and D). Compared with mice treated with the control virus, we found 101 up-regulated and 108 down-regulated genes in mouse hearts with edited *CaMKII $\delta$*  (Fig. 3K). Analysis of gene ontology terms revealed that pathways related to cardiac performance and disease—which were dysregulated in control AAV9 mice post-IR—were rescued in *CaMKII $\delta$* -edited mice post-IR (Fig. 3, L and M).

We found a substantial increase in the percentage of apoptotic cells in TUNEL-stained heart sections of mice post-IR compared with heart sections of sham-treated mice (Fig. 4, A and B). In contrast to the hearts of control mice post-IR, the percentage of apoptotic cells in *CaMKII $\delta$* -edited mice was comparable to the hearts of sham-treated mice. We also found a 2.7-fold increase in the area of fibrotic tissue in mice post-IR whereas the *CaMKII $\delta$* -edited mice were protected against fibrosis post-IR (Fig. 4, C and D, and figs. S15 and S16). We

observed an increase in myocardial infiltration of inflammatory cells in mice post-IR, but this was not seen in hearts of *CaMKII $\delta$* -edited mice (fig. S15).

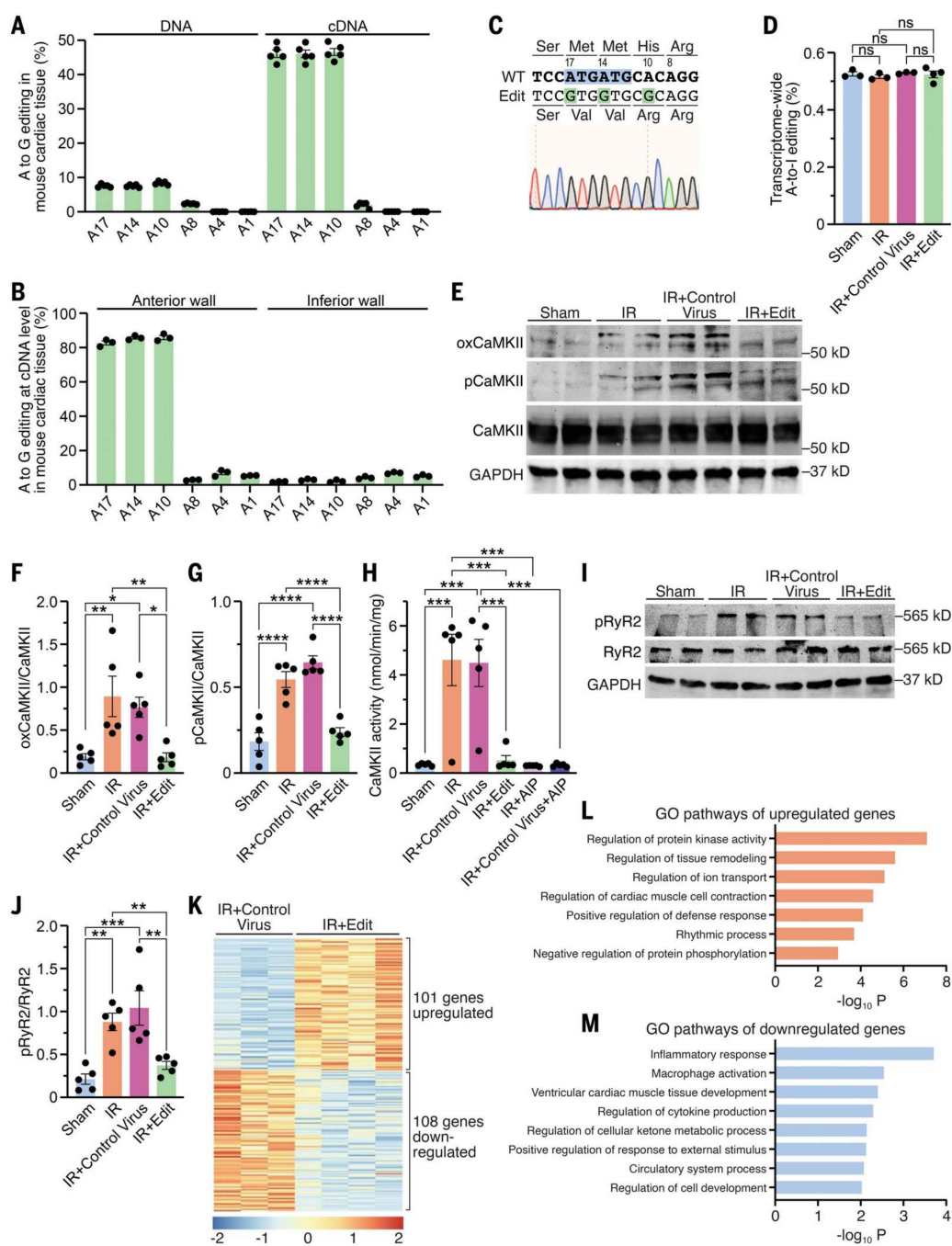
To test for potential long-term adverse effects of *CaMKII $\delta$*  editing, we analyzed mice 260 days after intraperitoneal injection of AAV-ABE-sgRNA6 at P5. Compared with noninjected littermates, we detected no difference in body weight (fig. S17). Since oxidized CaMKII has previously been linked to exercise performance (especially in skeletal muscle), we challenged these mice with a treadmill exhaustion test (28). We observed no difference in exercise performance, and immediate echocardiography after exhaustion revealed normal cardiac function in mice subjected to cardiac-specific *CaMKII $\delta$*  editing 260 days earlier (fig. S17).

### Discussion

*CaMKII $\delta$*  inhibition has previously been proposed as a therapy for cardiac disease, and several CaMKII inhibitors have been tested in preclinical studies (15–17). However, these CaMKII inhibitors face several challenges

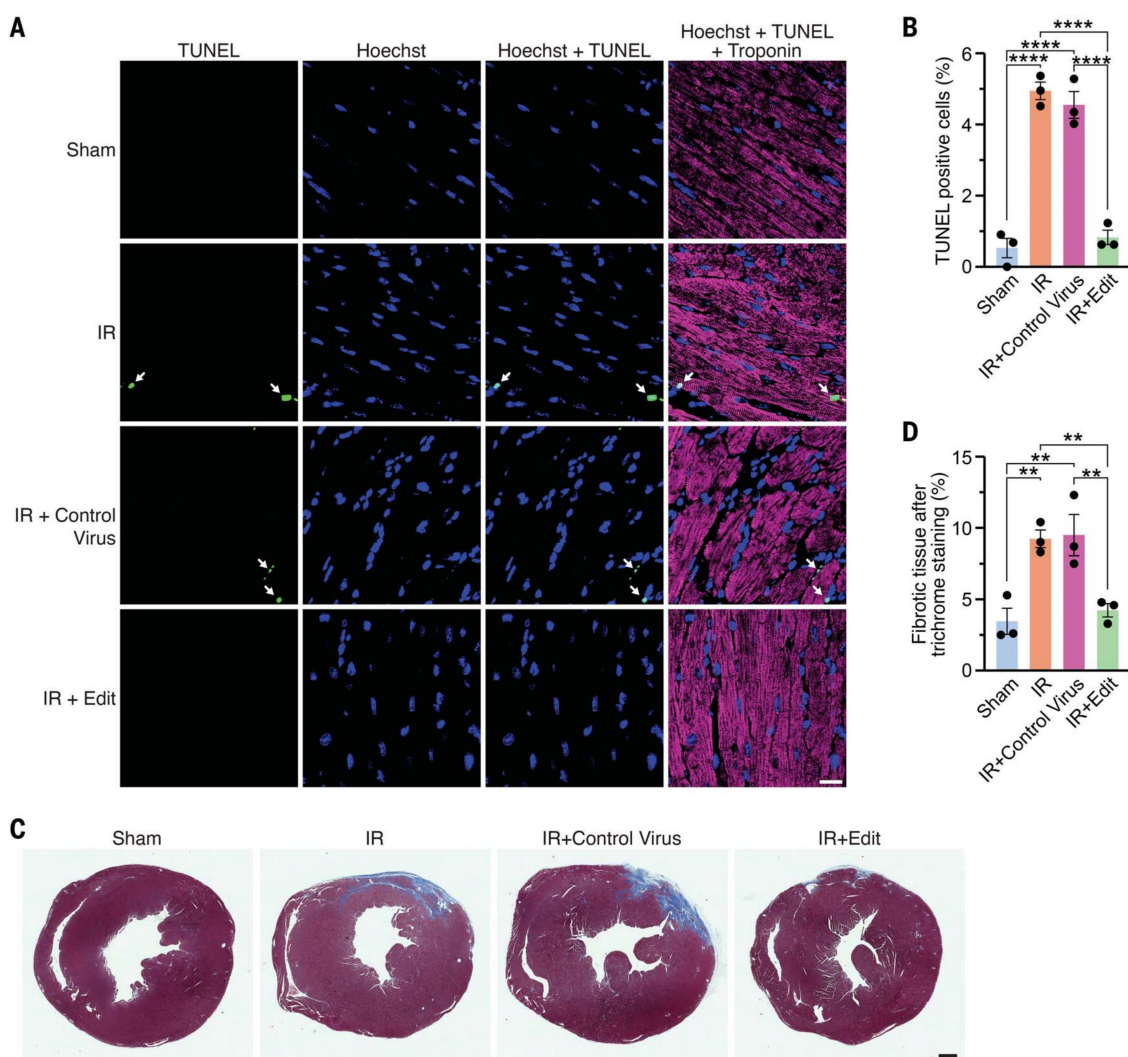
(15), as some were reported to inhibit other ion channels (for example potassium channels) (29) and others showed few therapeutic benefits (15–17). Specific CaMKII $\delta$  inhibitors that are ATP-competitive inhibitors also inhibit other kinases with potential deleterious effects, and other inhibitors are not bioavailable or cell permeable (15, 16). Another challenge in using CaMKII $\delta$  inhibitors is that CaMKII $\delta$  is ubiquitously expressed and its global inhibition can have adverse effects in tissues other than the heart (27). Another clinical limitation of using CaMKII $\delta$  inhibitors is the requirement for daily administration. Using the CRISPR-Cas9 ABE system to edit the genome provides a permanent change to the *CaMKII $\delta$*  gene and overrides many of the above limitations. Incorporation of the cTnT promoter to restrict expression of the ABE components exclusively to the heart also prevents possible adverse consequences of CaMKII $\delta$  inhibition in other tissues. Moreover, CRISPR-Cas9 gene editing is permanent, representing a “one and done” therapy (30).





**Fig. 3. Analysis of mouse hearts after *CaMKIIδ* in vivo genomic editing by administration of AAV-ABE-sgRNA6.** (A) Percentage of adenine (A) to guanine (G) editing of DNA and cDNA for each adenine along sgRNA6 in the myocardium of mice treated with AAV-ABE-sgRNA6, as determined by deep amplicon sequencing. (B) Spatial analysis of adenine (A) to guanine (G) editing efficiency at the cDNA level for each adenine along sgRNA6 in the anterior and the inferior cardiac wall of mice injected with AAV-ABE-sgRNA6 in the anterior cardiac wall, as determined by Sanger sequencing. (C) Sequencing of a TOPO-TA clone shows in vivo editing of the *CaMKIIδ* gene at the cDNA level. (D) Percentage of transcriptome-wide adenine (A) to inosine (I) editing in the myocardium of sham-treated, IR, IR treated with a control virus, and IR-edited mice. (E) Western blot analysis of oxidized CaMKII, autophosphorylated CaMKII, total CaMKII, and GAPDH for all groups. (F) Mean densitometric analyses for oxidized CaMKII normalized to total CaMKII for sham-treated, IR, IR treated with a control virus, and IR-edited mice. (G) Mean densitometric analyses for autophosphorylated

CaMKII normalized to total CaMKII for all groups. (H) Mean CaMKII activity for all groups and for lysates of IR and IR+Control Virus mice, both in presence of the CaMKII inhibitor AIP. (I) Western blot analysis of ryanodine receptor type 2 (RyR2) phosphorylation at the CaMKII site (serine 2814), total RyR2, and GAPDH for all groups. (J) Mean densitometric analysis for phosphorylated RyR2 normalized to total RyR2 for all groups. (K) Heat map of 209 differentially expressed genes between mice subjected to IR and injected with either a control AAV9 ( $n = 3$ ) or AAV-ABE-sgRNA6 for editing of the *CaMKIIδ* gene ( $n = 4$ ). (L) Gene ontology terms associated with the 101 genes up-regulated in mouse hearts injected with AAV-ABE-sgRNA6 compared to mice receiving control AAV9. (M) Gene ontology terms associated with the 108 genes down-regulated in mouse hearts injected with AAV-ABE-sgRNA6 compared to mice injected with control AAV9. All replicates are individual mice. Statistical comparisons are based on one-way ANOVA post-hoc corrected by Holm-Sidak. Data are presented as individual data points with means  $\pm$  SEM.



**Fig. 4. Genomic editing of *CaMKII $\delta$*  prevents cardiac cell death and fibrosis after IR. (A)** Immunohistochemistry of TUNEL (green, arrows), Hoechst 33342 (blue, for all nuclei), and cardiac troponin (recolored in purple for colorblind accessibility) in representative heart sections of mice subjected to sham surgery, IR, IR treated with a control AAV9, and IR treated with AAV-ABE-sgRNA6 (IR+Edit; scale bar 20  $\mu$ m). **(B)** Mean percentage of

TUNEL-positive cells in each group. **(C)** Whole transverse cross-sections of trichrome stained hearts for each group (scale bar 500  $\mu$ m). **(D)** Mean percentage of fibrotic cardiac tissue in each group. Replicates are individual mice. Statistical comparisons are based on one-way ANOVA post-hoc corrected by Holm-Sidak. Data are presented as individual data points with means  $\pm$  SEM.

In patients, administration of *CaMKII $\delta$*  editing components after a myocardial infarction could be achieved in conjunction with the standard of care in response to a heart attack. The first therapeutic step after a myocardial infarction is coronary angiography and revascularization of the infarct artery, which requires a catheter that could also be used to deliver *CaMKII $\delta$*  editing components to the infarct artery or to the infarct area (31). Before starting initial human clinical trials, future studies are needed including more analyses of the pharmacological profile, optimization of the viral dosage, more studies regarding the toxicity and safety of the treatment (such as potential immunogenicity of the base editor), and assessment of animal long-term survival.

We analyzed the top eight predicted sites in the human genome for potential off-target editing, but a deeper analysis (32), especially after extended exposure to the base editor, will be required for formal regulatory review. It will also be necessary to analyze the interaction with other drugs and treatments as well as the effectiveness of *CaMKII $\delta$*  editing compared to currently available heart failure medication. Further studies showing a benefit in larger animals such as pigs and nonhuman primates would also be an important step toward clinical advancement of this approach.

CRISPR-Cas9 gene editing technology is typically used to correct specific genetic mutations before disease onset (1–6). Since the total num-

ber of patients carrying one specific mutation is usually low, the offered treatment affects only a limited group of patients. CRISPR-Cas9 gene editing has already been used to knock down WT *PCSK9* gene in the liver as a strategy for hereditary familial hypercholesterolemia (32). Our strategy is designed to ablate a detrimental pathway in the adult heart and thereby provide therapeutic benefits for already-established heart disease. The concept of using CRISPR-Cas9 to block activation of deleterious pathways is also translatable to other signaling cascades in other human diseases.

#### REFERENCES AND NOTES

1. N. Liu, E. N. Olson, *Circ. Res.* **130**, 1827–1850 (2022).
2. F. Chemello et al., *Sci. Adv.* **7**, eabg4910 (2021).

3. M. F. Richter *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **38**, 883–891 (2020).
4. L. Armoasii *et al.*, *Science* **362**, 86–91 (2018).
5. L. Armoasii *et al.*, *Nat. Commun.* **10**, 4537 (2019).
6. L. W. Koblan *et al.*, *Nature* **589**, 608–614 (2021).
7. S. S. Virani *et al.*, *Circulation* **143**, e254–e743 (2021).
8. J. Beckendorf, M. M. G. van den Hoogenhof, J. Backs, *Basic Res. Cardiol.* **113**, 29 (2018).
9. S. Neef *et al.*, *Circ. Res.* **106**, 1134–1144 (2010).
10. J. Backs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 2342–2347 (2009).
11. S. Lebek *et al.*, *Circ. Res.* **126**, 603–615 (2020).
12. T. Zhang, J. H. Brown, *Cardiovasc. Res.* **63**, 476–486 (2004).
13. H. Ling *et al.*, *Circ. Res.* **112**, 935–944 (2013).
14. M. Luo *et al.*, *J. Clin. Invest.* **123**, 1262–1274 (2013).
15. D. Nassal, D. Gratz, T. J. Hund, *Front. Pharmacol.* **11**, 35 (2020).
16. P. Pellicena, H. Schulman, *Front. Pharmacol.* **5**, 21 (2014).
17. S. Lebek *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **118**, 159–168 (2018).
18. J. R. Erickson *et al.*, *Cell* **133**, 462–474 (2008).
19. A. Purohit *et al.*, *Circulation* **128**, 1748–1757 (2013).
20. M. Zhang *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **21**, 1152–1163 (2019).
21. N. M. Gaudelli *et al.*, *Nature* **551**, 464–471 (2017).
22. A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris, D. R. Liu, *Nature* **533**, 420–424 (2016).
23. L. W. Koblan *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **36**, 843–846 (2018).
24. R. T. Walton, K. A. Christie, M. N. Whittaker, B. P. Kleinstiver, *Science* **368**, 290–296 (2020).
25. J. P. Concordet, M. Haeussler, *Nucleic Acids Res.* **46** (W1), W242–W245 (2018).
26. K. Clement *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **37**, 224–226 (2019).
27. M. Uhlén *et al.*, *Science* **347**, 1260419 (2015).
28. Q. Wang *et al.*, *Nat. Commun.* **12**, 3175 (2021).
29. B. Hegyi *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **89** (Pt B), 173–176 (2015).
30. D. R. Karri *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **28**, 154–167 (2022).
31. J. S. Lawton *et al.*, *Circulation* **145**, e18–e114 (2022).
32. K. Musunuru *et al.*, *Nature* **593**, 429–434 (2021).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Chai, Y. Zhang, and all other members of the Olson laboratory for helpful discussions; D. Alzhanov for technical assistance; J. Cabrera for graphics; J. Xu and Y. J. Kim from the CRI for Illumina NextSeq sequencing; C. Rodriguez-Caycedo for help with the iPSCs; J. Wansapura from the UTSW Advanced Imaging Research Center for mouse MRIs; Y. Zhang and the Boston Children's Hospital Viral Core for virus production; J. Shelton from the Molecular Histopathology Core for helping with histology; the UTSW McDermott Center Sanger Sequencing Core; the UTSW McDermott Center Next Generation Sequencing Core; and the UTSW Flow Cytometry Core. Funding was provided by the following: National Institutes of Health grant R01HL130253 (to E.N.O. and R.B.-D.); National Institutes of Health grant R01HL157281 (to E.N.O. and R.B.-D.); National Institutes of Health grant P50HD087351 (to E.N.O. and R.B.-D.); Fondation Leducq Transatlantic Network of Excellence (to E.N.O.); Robert A. Welch Foundation 1-0025 (to E.N.O.); German Research Foundation (DFG) LE 5009/1-1 (to S.L.); German Cardiac Society (to S.L.); Cancer Prevention and Research Institute of Texas RP210099 (UTSW Advanced Imaging Research Center). **Author contributions:** Conceptualization: S.L. and E.N.O. Methodology: S.L., F.C., and W.T. Investigation: S.L., F.C., X.M.C., W.T., and H.L. Formal analysis: S.L., F.C., W.T., K.C., and L.X. Visualization: S.L., W.T., K.C., and L.X. Funding acquisition: S.L., R.B.-D., and E.N.O. Resources: R.B.-D.

and E.N.O. Project administration: S.L., R.B.-D., and E.N.O. Supervision: R.B.-D. and E.N.O. Writing – original draft: S.L. Writing – review and editing: N.L., R.B.-D., and E.N.O. **Competing interests:** E.N.O. is a consultant for Vertex Pharmaceuticals, Tenaya Therapeutics, and Cardurion Pharmaceuticals. S.L., R.B.-D., and E.N.O. are inventors on patent application (63/352,804) submitted by UT Southwestern Medical Center that covers “Stress Editing of CaMKII $\beta$ ”. The other authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** RNA-seq data have been deposited at Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE210494. All other data are available in the main text or the supplementary materials. **License information:** Copyright © 2023 the authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original US government works. <https://www.sciencemag.org/about/science-licenses-journal-article-reuse>

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

[science.org/doi/10.1126/science.ade1105](https://science.org/doi/10.1126/science.ade1105)  
Materials and Methods  
Figs. S1 to S17  
Tables S1 to S5  
References (33–38)  
MDAR Reproducibility Checklist  
Movies S1 to S4

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

Submitted 27 July 2022; resubmitted 25 October 2022  
Accepted 14 December 2022  
10.1126/science.ade1105



## Ablation of CaMKII $\beta$ oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease

Simon Lebek, Francesco Chemello, Xurde M. Caravia, Wei Tan, Hui Li, Kenian Chen, Lin Xu, Ning Liu, Rhonda Bassel-Duby, and Eric N. Olson

*Science*, 379 (6628), .

DOI: 10.1126/science.ade1105

### Editing away heart disease

Ischemia-reperfusion injury, tissue damage that occurs after oxygen deprivation, can be observed after a variety of insults, including common ones such as heart attack or stroke. A key protein that plays a role in this damage is calcium calmodulin-dependent protein kinase II $\beta$  (CaMKII $\beta$ ). Lebek *et al.* found that targeting CaMKII $\beta$  using CRISPR-Cas9 gene editing was a viable intervention to protect the heart tissue from ischemia-reperfusion damage in mouse models. Injecting gene editing reagents soon after ischemia exposure was sufficient for the mice to recover from severe heart damage, suggesting that it may not be too late to intervene after a heart attack happens. —YN

### View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.ade1105>

### Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

*Science* (ISSN ) is published by the American Association for the Advancement of Science. 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2023 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works