

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ЛЕЧЕНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ветчинова А.С., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н.

Научный центр неврологии, Москва

Нейродегенеративные заболевания (НЗД) остаются одной из ключевых проблем современной неврологии. Болезнь Альцгеймера (БА) – основная форма первичной деменции в современном обществе, характеризующаяся преимущественно прогрессирующей гибелью нервных клеток гиппокампа и коры больших полушарий. Гистологическое исследование мозга выявляет отложения бета-амилоидного белка в виде сенильных бляшек и агрегаты фосфорилированной формы тау-белка в составе нейрофибрилярных клубков. Моногенные формы БА связаны мутациями генов *APP*, *PSEN1* и *PSEN2*, а наиболее значимый фактор генетической предрасположенности при спорадических случаях – $\epsilon 4$ -аллель гена *APOE* (19q13.2) [4]. Болезнь Паркинсона (БП) занимает второе место по частоте встречаемости среди НЗД и характеризуется синдромом паркинсонизма в сочетании с рядом немоторных симптомов. Основные клинические проявления БП связаны с поражением дофаминергических нейронов чёрной субстанции ствола мозга. Менделеевское наследование встречается в 5–10% случаев БП, причем среди 20 генов данного заболевания основное значение имеют гены *SCNA* (альфа-синуклеин), *PARK2* (паркин), *LRRK2* (дардарин), *PINK1*, *VPS35*, *GBA* (глюкоцереброзидаза) [3]. К тяжелым и социально значимым формам НЗД относятся также боковой амиотрофический склероз (БАС), при котором наиболее часто встречаются мутации в генах *SOD1* (Cu/Zn-супероксиддисмутаза) и *C9orf72* [1], болезнь Гентингтона (БГ) с типичной «полиглутаминовой» мутацией в гене *HTT* [4] и др.

БА, БП, БАС и другие НЗД характеризуются присутствием накопления аномальных агрегированных белков: внеклеточные бета-амилоидные бляшки и внутриклеточные тау-клубки при БА, альфа-синуклеиновые тельца и нейриты Леви при БП, агрегаты SOD-1 или TDP-43 при БАС [11, 19]. Предполагается, что хроническая продукция патологического белка может быть причиной прогрессирующей гибели нейронов, опосредованной общими молекулярными механизмами и метаболическими путями [22].

Перспективными молекулярными методами лечения больных с НЗД, считаются коррекция экспрессии патологического гена, иммунотерапия против аномальных белков ЦНС, клеточная регенеративная терапия и сочетание генной инженерии с клеточной терапией – трансплантация генетически модифицированных стволовых клеток. Широко изучается также явление РНК-интерференции: исследователь может инъецировать двуцепочечные фрагменты РНК, комплементарные участку мРНК таргетного гена, что приведет к расщеплению образовавшегося гибрида и предотвратит трансляцию мутантного гена.

Моделирование нейродегенеративных болезней с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Исследование культур нейронов, получаемых путем направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), позволяет оценить взаимосвязь между дегенеративными изменениями и характером клинического синдрома. Такие культуры могут служить уникальной моделью для тестирования различных соединений на нейропротекторную активность и использоваться для мониторинга нейродегенеративных изменений на фоне терапевтических вмешательств [5]. Исследования механизмов репрограммирования и дифференцировки клеток человека имеют большое значение как для фундаментальной науки, так и (в перспективе) для развития клеточной терапии.

Лечение НЗД, патогенез которых обусловлен мутациями конкретных генов, требует вмешательства в организм больного на геномном уровне. В настоящее время для коррекции экспрессии гена-мишени существует ряд подходов, некоторые из которых остаются экспериментальными, тогда как другие уже проходят клинические исследования. Растущую роль в современной нейробиологии играют новые высокотехнологичные подходы к моделированию НЗД. Среди них – направленное *геномное редактирование* с помощью искусственных нуклеазных систем, позволяющее осуществлять коррекцию генетических дефектов на уровне клеток. Перспективным представляется применение технологии геномного редактирования на специализированных нейронах и ИПСК, получаемых от больных с наследственными формами НЗД в результате клеточного репрограммирования [23]. ИПСК, полученные из зрелых соматических клеток, представляют собой уникальную платформу для изучения генов, вовлеченных в молекулярные механизмы возникновения аномальных фенотипов, моделирования заболеваний на тканях, изучения действия лекарственных препаратов.

Редактирование генома с помощью нуклеаз «цинковых пальцев». Первым инструментом для коррекции генома стала эндонуклеаза «цинковые пальцы» (ZNF – особые химически активные домены белка), представляющая собой белковый комплекс из разрезающего ДНК фермента и ДНК-связывающего домена. Когда две нуклеазы соединяются со своими мишенями, находящимися на расстоянии 5-7 п.о. друг от друга в правильной ориентации, нуклеазный домен димеризуется и вносит двухнитевый разрыв в ДНК в интересующем локусе, после чего осуществляется гомологическая репарация или негомологическое соединение концов ДНК [16].

Использование данного подхода позволило внести мутации A53T (G209A) и E46K (G188A) в ген *SNCA* эмбриональных культур человеческих клеток для воссоздания модели БП, обусловленной данными мутациями. Экспрессия мутантного альфа-синуклеина в нейронах, полученных из модифицированных стволовых клеток, была сравнима с таковой в нейронах, полученных в результате дифференцировки пациент-специфических ИПСК

от больного с БП с данной мутацией [21]. Одновременно была проведена коррекция мутации с помощью ZNF в ИПКС, полученных из фибробластов пациента с БП: показано отсутствие мутантного белка в дофаминергических нейронах, полученных в результате дифференцировки скорректированных ИПКС [21]. Система ZNF позволяет также регулировать экспрессию генов путем создания химерных конструкций; так, химерный белок ZNF-KRAB использовался для подавления экспрессии гена *HTT* в мозге мышей линии R6/2, служащих моделью БГ [14].

Технология ZNF стала первым программируемым инструментом для коррекции генома, однако она подразумевает использование белков, которые сложно модифицировать для применения с новыми генами-мишенями и сложно доставлять компоненты данной системы в клетки.

Редактирование генома с помощью системы TALEN. В системе TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases) роль ДНК-распознающих структур играют белковые домены, каждый из которых «узнает» только один нуклеотид [8]. Соединяя ДНК-узнающий фрагмент с ферментом, расщепляющим ДНК, можно получить систему с высокой специфичностью действия.

Примером использования системы TALEN для создания модели БП стало внесение в геном рыбы зебры мутантного гена *GBA* [13]. В другой работе в культуре стволовых клеток, полученных из фибробластов пациента с БГ, в первом экзоне с помощью системы TALEN была скорректирована экспансия CAG-повторов, причем коррекция сохранилась при дифференцировке ИПСК в специализированные нейроны *in vitro* и *in vivo*; это сопровождалось нормализацией ряда сигнальных путей передачи сигнала (BDNF и др.), повышением устойчивости клеток и нормализацией работы митохондрий в нейрональных предшественниках [7]. При полногеномном секвенировании 1795 пожилых жителей Исландии в гене белка-предшественника бета-амилоида (*APP*) была обнаружена мутация (A673T), которая защищает от БА и когнитивного снижения в пожилом возрасте [12]. С помощью системы TALEN культуры стволовых клеток вводили мутацию A673V в ген *APP*, что способствовало развитию альцгеймеровской патологии за счет повышения агрегации и токсичности белка, тогда как введение мутации A673T сопровождалось снижением расщепления белка *APP*, что может служить защитой от развития БА [12].

Несмотря на относительную легкость и дешевизну синтеза по сравнению с комплексами «цинковые пальцы», белки TALENs достаточно сложно синтезировать и доставлять внутрь клеток. Также проблемой является возможность непреднамеренных разрезов ДНК.

Редактирование генома с помощью CRISPR/CAS 9. Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) за короткое время нашла применение в самых различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и медицины. С помощью системы CRISPR/Cas9 можно осуществлять все виды модификаций генома: вносить точковые мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов [2].

Так, например, с помощью системы CRISPR/Cas9 и однопочечного донора удалось отредактировать гетерозиготную мутацию в 4-м экзоне гена *PSEN1* в ИПСК, полученных из фибробластов пациентки с БА. Скорректированная клеточная линия в сопоставлении с мутантной линией является очень полезным ресурсом для изучения патологических клеточных фенотипов, связанных с этой конкретной мутацией [17]. Используя систему CRISPR/Cas9, исследователям удалось на карликовых свиньях выключить одновременно три гена, ассоциированных с БП – *DJ-1*, *PARK2* и *PINK1* [Wang et al., 2016]. В результате полногеномного секвенирования не было выявлено нецелевых замен и мутаций в геноме эмбрионов. Таким образом, простота, эффективность и мощность системы CRISPR/Cas9 позволяют модифицировать от одного до нескольких генов у модельных животных, что предоставляет в руки исследователей поистине уникальные экспериментальные возможности в моделировании и изучении нейродегенеративных заболеваний [Wang et al., 2016].

Плюрипотентные стволовые клетки человека, включая эмбриональные клетки и ИПСК, являются важнейшим инструментом регенеративной медицины. После трансплантации в мозг модельных животных дифференцированные из стволовых клеток нейрональные предшественники выживают, созревают и способствуют поведенческому восстановлению в моделях БП [5], БГ [15], эпилепсии [10]. Эти результаты подчеркивают потенциал ИПСК в лечении НЗД. Однако трансплантированные клетки не всегда интегрируются в правильные нейронные контуры и могут не вполне адекватно компенсировать утраченную функцию, что иногда чревато развитием серьезных побочных эффектов (таких, например, как тяжелые дискинезии при трансплантации дофаминергических нейронов). Одним из решений является разработка функционального «переключателя» в трансплантированных клетках, так что высвобождение нейротрансмиттера в них можно строго контролировать. Хомогенетические инструменты, в том числе DREADD (дизайнерский рецептор, активируемый исключительно дизайнерским препаратом), позволяют эффективно регулировать клеточную функцию [20]. DREADD – это семейство рекомбинантных G-протеиновых рецепторов, которые могут точно контролировать определенные сигнальные пути. Эти рецепторы могут активироваться фармакологически инертными соединениями, такими как клозапин-N-оксид (CNO), но не их нативным лигандом ацетилхолином. CNO можно принимать перорально, он легко проникает через гематоэнцефалический барьер, что позволяет дистанционно управлять экспрессирующими DREADD-нейронами в мозге [6]. Чен и соавторы пересадили человеческие дофаминергические нейроны, полученные из ИПСК, в мозг мыши с моделью БП, при этом рецептор DREADD в ИПСК был активирован с применением системы CRISPR/CAS9. Было обнаружено, что активность человеческих дофаминергических нейронов точно регулируется *in vitro* и *in*

in vivo, включая передачу сигналов между имплантированными нейронами и стриатными нейронами хозяина [9]. Основной проблемой при геномном редактировании является доставка систем редактирования в ядро и вероятность появления потенциально опасных непреднамеренных разрывов ДНК.

Заключение. Модели НДЗ на основе ИПКС, помимо их применения для поиска новых лекарств, позволяют преодолевать трудности в изучении механизмов развития этих заболеваний, которые отчасти связаны с ограниченным доступом к человеческим нервным клеткам. Растущую роль в современной нейробиологии играют новые высокотехнологичные подходы к моделированию нейродегенеративных заболеваний человека. Среди них

– направленное геномное редактирование с помощью искусственных нуклеазных систем (CRISPR/Cas9 и др.), позволяющее осуществлять коррекцию генетических дефектов на уровне клеток. Особенно перспективным представляется применение технологии геномного редактирования на специализированных нейронах и ИПКС, полученных от больных с наследственными формами нейродегенерации в результате клеточного репрограммирования [23]. Геномное редактирование позволяет быстрое и высокоэффективное создание нокаутных линий ИПКС для работ, связанных с изучением функций генов, а также с внесением мутаций в геном ИПКС для точного воспроизведения условий изучаемой болезни и возможной коррекции дефекта гена.

В целом, технология редактирования генома пока достаточно медленно находит применение в клинике, но ее большое будущее несомненно.

Благодарность. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований №16-04-016627 А.

Литература

- Абрамчычева Н.Ю., Лысогорская Е.В., Шпилюкова Ю.С. и др. Молекулярная структура бокового амиотрофического склероза в российской популяции // *Нервно-мышечные болезни*. 2016; 4: 21–27.
- Васильева Е.А. Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas к плюрипотентным стволовым клеткам // *Цитология* 2015; 1: 19–30.
- Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона // *Неврол. журн.* 2015; 4: 4–13.
- Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М.: МИА, 2002.
- Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. и др. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2011; 4: 37–45.
- Alexander G.M., Rogan S.C., Abbas A.I. et al. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors // *Neuron* 2009; 63: 27–39.
- An M.C., Zhang N., Scott G. et al. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2012; 11: 253–263.
- Chen K., Gao C.J. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants // *Genet. Genomics* 2013; 40: 271–279
- Chen Y., Xiong M., Dong Y. et al. Chemical control of grafted human PSC-derived neurons in a mouse model of Parkinson's disease // *Cell Stem Cell* 2016; 18: 817–826.
- Cunningham M., Cho J.H., Leung A. et al. hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice // *Cell Stem Cell* 2014; 15: 559–573.
- Ghiglieri V., Calabrese V., Calabresi P. Alpha-synuclein: from early synaptic dysfunction to neurodegeneration // *Front. Neurol.* 2018; 9: 295.
- Jonsson T., Atwal J.K., Steinberg S. et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline // *Nature* 2012; 488 (7409): 96–99.
- Keatinge M., Bui H., Menke A. et al. Glucocerebrosidase 1 deficient *Danio rerio* mirror key pathological aspects of human Gaucher disease and provide evidence of early microglial activation preceding alpha-synuclein-independent neuronal cell death // *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24: 6640–6652.
- Li Y., Moore R., Guinn M., Bleris L. Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression // *Sci Rep.* 2012; 2: 897.
- Ma L., Hu B., Liu Y. et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice // *Cell Stem Cell* 2012; 10: 455–464.
- Moynahan M.E., Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis // *Nat. Rev. Cell Biol.* 2010; 11:196–207.
- Pires C., Schmid B., Petzjus C. et al. Generation of a gene-corrected isogenic control cell line from an Alzheimer's disease patient iPSC line carrying a A79V mutation in PSEN1 // *Stem Cell Res.* 2016; 17: 285–288.
- Wang X., Cao C., Huang J. et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system // *Sci Rep.* 2016; 6: 20620.
- Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B. et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis // *Science* 2008; (5870): 1668–1672.
- Sternson S.M., Roth B.L. Chemogenetic tools to interrogate brain functions // *Annu. Rev. Neurosci.* 2014; 37: 387–407.

Soldner F., Laganieri J., Cheng A. et al. Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations // Cell 2011; 146: 318-331.

Williams A.J., Paulson H.L. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited // Trends Neurosci. 2008; 31: 521-528.

Xiong X., Chen M., Lim W.A., Zhao D., Qi L.S. CRISPR/Cas 9 for humangenome engineering and disease research. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 2016; 17: 131-154.