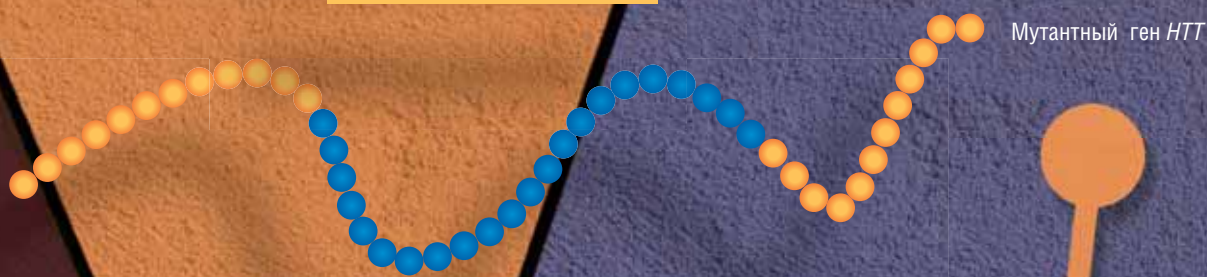
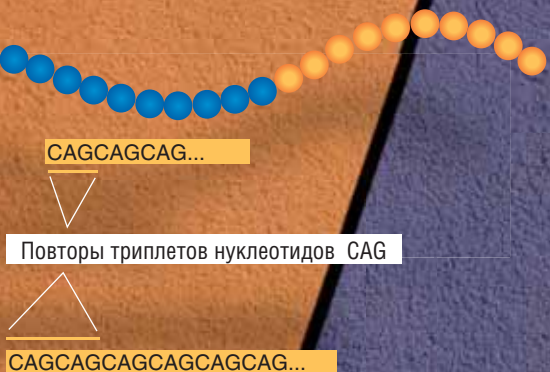


Т.Б. МАЛАНХАНОВА, С.М. ЗАКИЯН



«Здоровый» ген *HTT*, кодирующий белок хантингтин



CRISPR/Cas9 против болезни ГЕНТИНГТОНА

Ключевые слова: редактирование генома, болезнь Гентингтона, моделирование заболеваний, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, изогенные линии клеток.

Key words: genome editing, Huntington's disease, disease modeling, induced pluripotent stem cells, isogenic cell lines

© Т.Б. Маланханова, С.М. Закиян, 2017

Сегодня, по данным Гарвардского центра нейроисследований, только в США около 5 млн человек страдают от болезни Альцгеймера; 1 млн – от болезни Паркинсона; 400 тыс. – от рассеянного склероза; по 30 тыс. – от бокового амиотрофического склероза (болезнь Лу Герига) и болезни Гентингтона. Эти расстройства, относящиеся к группе нейродегенеративных заболеваний, плохо изучены, и для них отсутствуют эффективные способы лечения. Решить эту проблему может помочь инструмент редактирования генов – система CRISPR/Cas9, которая на сегодняшний день активно и успешно применяется в биологии и медицине

За последние десятилетия средняя продолжительность жизни человека увеличилась, и теперь большее число людей доживает до того возраста, когда могут начать проявляться различные болезни, связанные со старостью. К таким «болезням старости» относятся и нейродегенеративные заболевания, большинство которых характеризуется постепенной и избирательной гибелью специфических типов нервных клеток. Причинами этих болезней чаще всего являются нарушения в геноме.

Рассмотрим эту проблему на примере болезни Гентингтона (другие названия – синдром Гентингтона, хорея Гентингтона или Хантингтона), проявляющейся такими симптомами, как нарастающая потеря двигательного контроля и психические расстройства. Несмотря на то, что генетическая мутация, вызывающая это заболевание, была выявлена более 20 лет назад, молекулярные механизмы его развития все еще до конца не выяснены, так же как не найдено эффективной терапии этой болезни.



МАЛАНХАНОВА Туяна Баировна – аспирант Новосибирского государственного университета, старший лаборант лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 3 научных работ и 1 монографии

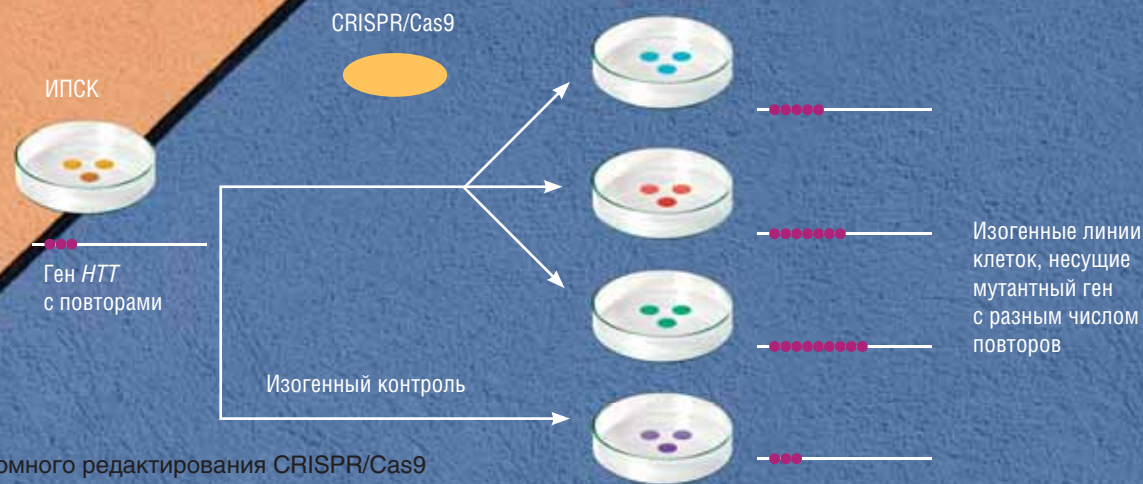
Моделируем болезнь

Причина болезни Гентингтона – увеличение числа тринуклеотидных повторов CAG в гене *HTT*, кодирующем белок *гентингтин*. В норме в этом гене содержится от 8 до 36 повторов, но, когда это число достигает 37 и более, начинается развитие заболевания. Триплет CAG кодирует аминокислоту *глутамин*. Соответственно, при болезни Гентингтона синтезируется гентингтин с удлинённой полиглутаминовой цепочкой. Такой белок имеет неправильную пространственную структуру и не может выполнять свою функцию в клетках, которая, кстати сказать, до сих пор точно неизвестна. Кроме того, в *стрiatуме*, одном из отделов мозга,



ЗАКИЯН Сурен Минасович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики, лабораторией стволовой клетки Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск); лабораторией молекулярной и клеточной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск), лабораторией клеточной инженерии ФЕН Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор более 200 научных работ, в том числе 33 монографий, и 5 патентов

У людей с болезнью Гентингтона наблюдаются неправильные и неконтролируемые движения практически всех мышц тела («пляска святого Витта»), а также психические и когнитивные нарушения. Это тяжелое заболевание обычно начинает проявляться после 35 лет и имеет прогрессирующий характер



Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 сегодня используется для создания клеточных линий, моделирующих болезнь Гентингтона, через получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток человека

регулирующих мышечный тонус, мутантный белок формирует агрегаты, обладающие токсическим эффектом. При этом тяжесть протекания болезни напрямую зависит от числа повторов CAG.

Чтобы исследовать молекулярные процессы, приводящие к развитию патологии, а также для тестирования новых лекарственных препаратов нужна биологическая модель, максимально близко воспроизводящая болезнь человека. Для создания модели болезни Гентингтона ученые внесли в геном лабораторных мышей мутантный ген *HTT* человека. Однако результаты, полученные в подобных «мышинных» моделях, не всегда точно отражают процессы, протекающие в организме человека. Выход – клеточные линии, полученные от человека.

Для изучения болезни Гентингтона необходимо иметь клетки стриатума, но получить такой биоматериал затруднительно. Эта проблема решается с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые достаточно легко с помощью перепрограммирования можно получить из клеток кожи или крови человека. Далее эти клетки можно наращивать в неограниченных количествах и дифференцировать (превращать) в практически любой нужный тип клеток.

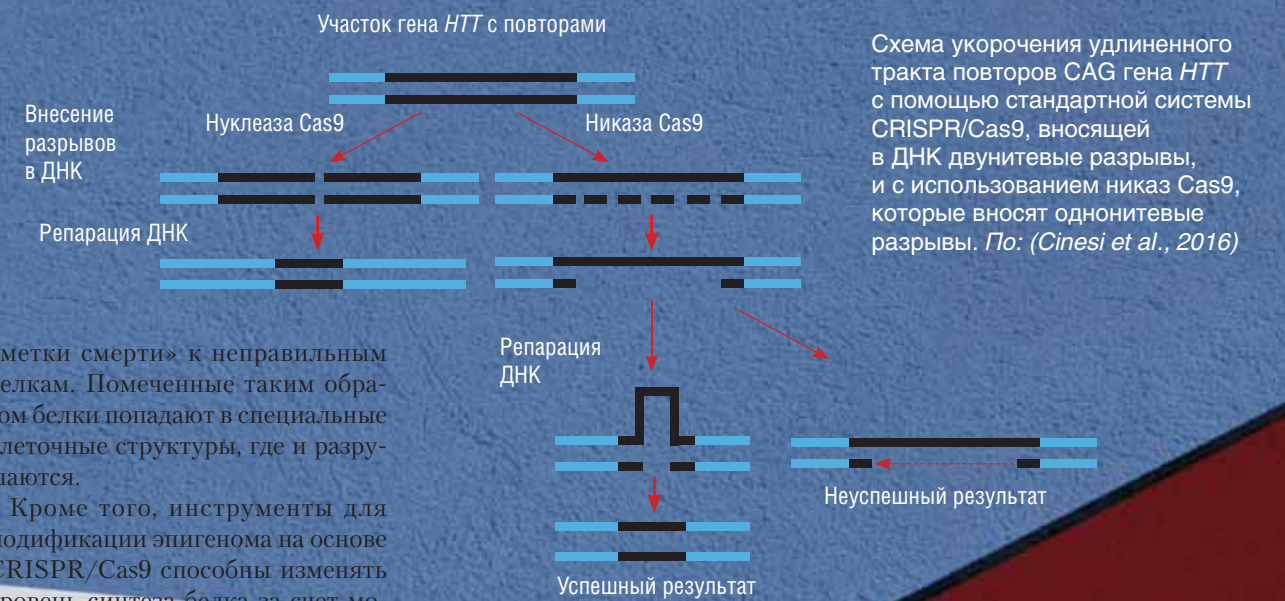
Обычно при моделировании болезней используют клетки от больных людей, а в качестве контроля – от здорового донора. Однако из-за наличия в геноме людей огромного числа однонуклеотидных полиморфизмов такие пары клеток не совсем корректно сравнивать. Идеальным контролем для «больных» клеток будут клетки с точно таким же геномом, но уже без мутации, вызывающей заболевание. Такие клетки называют *изогенными парами* или *линиями*. Для создания изогенных линий и используют инструмент для редактирования генов CRISPR/Cas9.

Исследуем генное окружение

Несмотря на то, что болезнь Гентингтона является *моногенным заболеванием*, т.е. обусловлена мутацией в одном гене, известно более 100 так называемых генов-модификаторов, которые могут повлиять на время возникновения первых симптомов, тяжесть заболевания и т.д. Наиболее удобным инструментом для выяснения роли этих генов в патогенезе болезни Гентингтона является система *GeCKO* на основе CRISPR/Cas9 (Shalem *et al.*, 2014). Она позволяет создавать целые библиотеки генов мишеней для CRISPR/Cas9 и выключать тысячи генов всего лишь за пару этапов. Таким образом, можно за короткий срок произвести *нокаут* (выключение) всех генов-модификаторов и выяснить, как это влияет на жизнеспособность клеток, скорость их деления и т.д.

С помощью инструментов на основе CRISPR/Cas9 сейчас можно редактировать не только геном, т.е. наследственную информацию, но и *эпигеном*, который отражает изменения в работе генов, не затрагивающие структуру ДНК. Благодаря геномному редактированию у нас появилась возможность менять уровень экспрессии целевых генов. Для этого уже разработаны инструменты, в которых используется «выключенный» Cas9, к нему присоединены различные ферменты, способные активировать или, напротив, подавлять уровень работы того или иного белка. Например, в случае болезни Гентингтона можно специфически подавлять синтез мутантного белка, тем самым препятствуя образованию белковых агрегатов и гибели нейронов стриатума.

Однако можно активировать и соединения, которые будут способствовать ускоренному удалению или деградации белков с неправильной структурой. Например, такой эффект достигается за счет активации белков теплового шока (*шаперонов*), которые прикрепляют



случае не изменяют длину участка с повторами, а в лучшем – приводят к его ожидаемому укорочению (Cinesi *et al.*, 2016).

Использовать стратегию выключения гена можно в тех редких случаях, когда между двумя копиями гена *HTT* имеются однонуклеотидные различия. Если такие полиморфизмы будут находиться по обе стороны от участка с неправильными повторами, их можно будет использовать как мишени для «ножниц» CRISPR/Cas9. При этом нормальная копия гена не будет затронута (Shin *et al.*, 2016).

Исследования болезни Гентингтона с применением системы CRISPR/Cas9 сегодня проводятся и в России. Так, в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) ведутся работы по получению изогенных линий стволовых клеток, моделирующих болезнь Гентингтона, путем внесения удлиненных трактов CAG в нормальный ген *HTT*, а также по дифференцировке ИПСК в нейроны стриатума. В дальнейшем новосибирские исследователи планируют перейти к изучению роли генов-модификаторов в патогенезе этой болезни с использованием клеточной модели.

Есть основания надеяться, что результаты исследований приведут к созданию эффективного метода лечения. Кроме того, они, возможно, помогут при изучении других нейродегенеративных заболеваний, развитие которых обусловлено подобной мутацией.

Литература

- Медведев С.П. Как отредактировать наследственность // *НАУКА из первых рук*. 2014. Т. 55. № 1. С. 10–14.
- Cinesi C., Aeschbach L., Yang B., Dion V. Contracting CAG/CTG repeats using the CRISPR-Cas9 nickase // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13272–13281.
- Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells // *Science*. 2014. V. 343. N. 6166. P. 84–87.
- Shin J.W., Kim K.-H., Chao M.J., *et al.* Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9 // *Hum. Mol. Genet.* 2016. V. 25. N. 20. P. 4566–4576.