

УДК 616.8

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНОМА ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2021 г. А. С. Ветчинова<sup>1</sup>, \*, Е. Ю. Федотова<sup>1</sup>, С. Н. Иллариошкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Направленное геномное редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9, внедренное в практику в последние годы и ставшее одним из наиболее впечатляющих достижений современной молекулярной биологии, позволяет эффективно корректировать генетическую информацию на уровне клеток. Для терапевтических целей важно вносить быстрые и точные изменения в нуклеотидную последовательность генома в условиях *in vivo*. И если редактирование генов включает в себя изменение самой нуклеотидной последовательности ДНК и непосредственную коррекцию генетической информации, то эпигенетическое редактирование направлено на контроль экспрессии определенных генов, в первую очередь, за счет изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме. Редактируя, таким образом, эпигеномные признаки, исследователи могут определить точную биологическую роль эпигенетической модификации в развитии той или иной патологии. В обзоре представлены фундаментальные и технологические основы эпигеномного редактирования, а также современные возможности данной передовой технологии в изучении нейродегенеративных заболеваний.

**Ключевые слова:** эпигенетика, регуляция активности генов, метилирование, CRISPR/Cas9, нейродегенеративные заболевания

**DOI:** 10.31857/S1027813321040154

### ВВЕДЕНИЕ

Направленное геномное редактирование позволяет эффективно корректировать генетическую информацию на уровне клеток. С помощью искусственных нуклеазных систем (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) можно осуществлять все виды таргетных модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов [1, 2]. После появления первых сведений о редактировании генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9, открытой в 2012 г. [3], было разработано множество методов, предлагающих те или иные модификации белков семейства Cas или направляющих РНК. Целый ряд работ посвящен использованию технологий, основанных на системе CRISPR/Cas, не только для редактирования геномов, но и для контроля экспрессии определенных генов, локализации и визуализации отдельных локусов ДНК в пространстве ядра, изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме млекопитающих [4].

В основу регуляции генной активности эукариот положено многоуровневое взаимодействие определенных участков ДНК с белками, которые называются транскрипционными факторами [5]. Взаимодействие регуляторных элементов, химические модификации ДНК, посттрансляционные модификации белков гистонов и строго контролируемое расположение этих гистонов, определяющее расположение хроматина влияют на экспрессию генов в различных типах клеток и стадиях клеточного цикла. Процесс, приводящий к изменению активности гена без изменения его нуклеотидной последовательности, называется эпигенетической регуляцией. Метилирование ДНК представляет собой особый механизм контроля активности генов, который получил максимальное развитие у высших эукариот и является эпигенетической модификацией, играющей решающую роль во многих регуляторных процессах. Он участвует в регуляции экспрессии транскрипционных генов, геномного импринтинга, инактивации X-хромосомы, сайленсинге подвижных элементов и поддержании целостности генома [6]. Метилирование ДНК характерно для широкого круга эукариот и чаще всего происходит в палиндромных CpG-динуклеотидах. Для центромерных, околицентромерных и повторяющихся элементов ха-

\* Адресат для корреспонденции: 125367 Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80, e-mail: annvet@mail.ru.

рактрно гиперметилирование CpG-островков. Высокое метилирование CpG-островков также обнаружено внутри активно транскрибирующихся участков генома, в то время как CpG-динуклеотиды, связанные с промоторами генов, остаются в гипометилированном состоянии, что указывает на локальный контекст CpG метилирования и его связь с регуляторным потенциалом. Целенаправленное изменение метилирования ДНК представляет собой многообещающий метод для искусственной регуляции активности генов. И если ранее применение глобальных метилирующих и деметилирующих агентов не позволяло вносить конкретные изменения, и, следовательно, исследовать взаимосвязь конкретного эпигенетического статуса и развития заболевания, то редактирование эпигеномов на основе системы искусственных нуклеаз особенно полезно для исследования экспрессии генов в процессе развития, при целом ряде заболеваний, включая нейродегенеративные. Новые точные инструменты для редактирования эпигенома позволяют добавлять и удалять даже единичные эпигенетические метки. Это обеспечивает возможность выявления причинно-следственных связей и идентификации наиболее важных эпигенетических модификаций при определенном состоянии.

#### СУЩЕСТВУЮЩИЕ ВАРИАНТЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЭПИГЕНОМА

Для редактирования эпигенома используют “синтетические” белковые конструкции, состоящие из ДНК-связывающего домена, направленно узнающего специфическую последовательность, и эффекторного домена, вносящего определенную модификацию. Первыми инструментами для редактирования эпигенома являлись нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) [7], которые оставались популярными благодаря своим компактным размерам и сайт-специфическому связыванию с последовательностью мишени [8], а также системы на основе TALEN [9, 10] благодаря более простой сборке и нацеливанию по сравнению с ZFN. Однако эффективность обеих систем проигрывает системе CRISPR/Cas9 с точки зрения редактирования как генома, так и эпигенома ввиду легкости нацеливания направляющими РНК даже на несколько сайтов и нечувствительности к метилированию CpG [11, 12].

Одновременная инактивация доменов HNH и Ruv C нуклеазы SpCas 9 (*Streptococcus pyogenes*) превращает Cas9 в направляемый РНК/ДНК-связывающий белок, не разрезающий мишень. В результате каталитически мертвая Cas9 (dCas9), направляемая гид-РНК (gRNA), связывается с мишенью, но не расщепляет ее [13]. Таким образом, каталитически неактивный dCas9 был создан и сконструирован в качестве модуля нацеливания

ДНК для доставки эффекторных белков. Например, форма dCas9, сшитая с четырьмя тандемными копиями белка вируса простого герпеса VP16 (VP64), может активировать транскрипцию гена-мишени [14], а слияние фрагмента KRAB с системой gRNA/dCas9 оказалось наиболее эффективным в репрессии транскрипции гена-мишени [15] (табл. 1).

Помимо регулирования транскрипции, редактирование эпигенома может включать изменение посттрансляционных модификаций гистонов и метилирование участков ДНК. Новые высокоточные методики позволяют исследователям добавлять и удалять эпигенетические метки гистонов на определенных генах-мишенях. Действие этих модифицирующих ферментов приводит либо к активации гена через ацетилирование гистона или триметилирование лизина 4 гистона H3, либо к инактивации гена через метилирование промотора ДНК, деацетилирование гистона или деметилирование лизина 4 гистона H3. Метилирование ДНК может исполнять роль метки-закладки, формирующей белковые комплексы, как им себя вести относительно этого участка ДНК. Например, если метильные метки расположены на промоторе гена, то это обычно приводит к ингибированию экспрессии данного гена. Деметилирование промотора приводит к активации работы такого гена. Слияние dCas9 с ферментативным доменом TET1 или DNMT3A позволяет целенаправленно удалять или устанавливать метилирование ДНК, соответственно (табл. 2).

Для повышения эффективности редактирования эпигенома эффекторные домены могут быть связаны с dCas9 посредством системы SunTag, представляющей собой повторяющийся полипептидный массив, который способен рекрутировать несколько копий антител [26, 27]. Изменения экспрессии генов, индуцированные dCas9-SunTag-VP64, были в 25 раз выше по сравнению с обычной активацией, опосредованной dCas9-VP64 в том же локусе [14]. Используя комплекс dCas9-SunTag-DNMT3A, исследователи метилировали крупную область генома, определяя чувствительность к метилированию CTCF-фактора с довольно низким соотношением нецелевого метилирования [28]. Аналогично dCas9-SunTag-стратегии, система CRISPR-SAM также может быть использована для повышения эффективности редактирования эпигенома. В системе dCas9-SAM модифицированная gRNA содержит две копии шпильки РНК из бактериофага, которые взаимодействуют с РНК-связывающим белком оболочки MS2. Поскольку шпильки модифицированной gRNA находятся за пределами комплекса gRNA/dCas9, другие факторы транскрипции могут связываться с комплексом через MS2, не мешая сборке комплекса. Слитый белок MS2-P65-HSF1, взаимодействующий с dCas9-VP64, привлекает большое

**Таблица 1.** Применение эпизффекторов для регулирования работы генов

Эпизффектор	Эпигенетическая модификация	Особенность	Недостатки	Ссылки
Трансактиваторный домен VP64	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Увеличение активации транскрипции	“Первое поколение” активаторов транскрипции	14
VPR (VP64, p65, Rta)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Использование трех факторов транскрипции приводит к повышенной экспрессии гена-мишени	При нецелевом связывании способен репрессировать транскрипцию	16
SAM-активатор (VP64, p65, HSF1)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Достижение устойчивой транскрипционной активации сайтов-мишени осуществляется за счет синергетических взаимодействий между активационными доменами VP64, p65 и HSF1.	Необходима одновременная экспрессия MS2/P65/HSF1 и dCas9/VP64 с gRNA/MS2 векторов	17
LACE (CRY2/CIB1-VP64)	Привлечение активаторов транскрипции, увеличивается уровень H3K27ac, H3K4me	Под действием света молекула CRY2 изменяет свою форму и связывается с CIB1, обеспечивая доставку активаторов транскрипции к гену-мишени благодаря слиянию с dCas-VP64	Процедуры конструирования векторов технически сложны и требуют много времени	18
Репрессорный домен KRAB	Привлечение корепрессорных белков	Высокоспецифическая репрессии целевых участков ДНК с минимальными эффектами вне мишени. Исторически “первый” репрессор транскрипции, принятый для точных эпигенетических модификаций	Степень репрессии транскрипции варьирует в зависимости от эндогенного состояния хроматина	15
Домен KRAB-MeCP2	Привлечение корепрессорных белков, метилтрансфераз, гистоновых деацетилаз	Более высокая активность репрессора транскрипции, чем одна система KRAB	Доставка с помощью лентивирусных векторов технически сложнее по сравнению с обычной плазмидной трансфекцией	19

количество транскрипционных факторов на промотор гена мишени и увеличивает транскрипцию гена [17]. Использование белка оболочки MS2 для димеризации каталитических доменов в составе конструкции gRNA-dCas9-CDTET позволило осуществлять эффективное и специфическое деметилирование генов-мишеней. При этом деметилирование наблюдалось на расстоянии 100–300 п.н. от сайтов посадки gRNA [29]. С помощью производ-

ной конструкции dCas9-SunTag-p65-HSF1 (SPH), в которой домен VP64 заменен на p65-HSF1 (компонент dCas9-SAM), удалось одновременно активировать несколько генов и длинных некодирующих РНК, принадлежащих к группе некодирующих РНК эпигенетических модификаторов в мозге мышей. Нацеленная активация трех эндогенных нейрогенных факторов транскрипции привела к эффективному превращению астроцитов в функ-

**Таблица 2.** Применение эпизффекторов для редактирования эпигенома

Эпизффектор	Эпигенетическая модификация	Особенность	Недостатки	Ссылки
Коровый домен гистон ацетил-трансфераза P300	Ацетилирование гистонов	Возможность активировать экспрессию гена от дистальных энхансеров	Необходим пул gRNA для успешного восстановления экспрессии генов	20
Домены гистон метилтрансфераз PRDM9, G9A, DOT1L	Увеличение метилирования гистона H3K4me3	Эффективность активации экспрессии зависит от контекста хроматина в сайтах связывания gRNA	Высокая чувствительность к CpG-сайтам внутри мишени	21
Домен ДНК-деметилаза TET 1	Деметилирование ДНК	Длительная реактивация работы гена возможна даже при временной экспрессии конструкции	Важно знать критичные CpG-сайты внутри мишени	22
Деметилаза гистонов LSD1	Уменьшение уровня H3K27ac, H3K4me	Позволяет исследовать энхансеры, регулирующие экспрессию генов критически важных для поддержания эмбрионального состояния	Активность ограничена энхансерами	23
Метилтрансфераза гистонов Ezh2	Увеличение H3K27me3	Высокая эффективность в метилировании гистонов для подавления экспрессии	Временно влияет на работу гена	24
Метилтрансфераза DNMT3A-DNMT3L	Увеличение метилирования в CpG-островках	Существенно подавляется экспрессия гена при одновременном использовании нескольких gRNA	Глобальные нецелевые эффекты, независимые от gRNA и способов доставки	25, 53

циональные нейроны *in vivo*. [30] Исследования, сравнивающие активаторы dCas9, показали, что активаторы VPR, SunTag, SAM лучше всего активируют работу генов в различных типах и видах клеток и предоставляют множество возможностей для транскрипционных и эпигенетических манипуляций [31, 32].

Благодаря возможности образования комплекса dCas9-sgRNA с функциональными активирующими (VP64, VPR, SAM) или репрессирующими доменами (KRAB, KRAB-MeCP2), система dCas9-sgRNA может быть использована для регулирования экспрессии генов на уровне транскрипции, либо для активации генов (CRISPRa), либо для репрессии генов (CRISPRi). Системы CRISPRi/a относительно универсальны и включают следующие шаги: создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей dCas9-эпизффектор;

доставка пула gRNA, нацеленных на связывание с мишенями в непосредственной близости от промоторной области гена или сайтов начала транскрипции; анализ изменений уровней мРНК и белка, а также анализ функциональных последствий этих изменений. [15, 33]. Данный метод на основе CRISPRi/a все чаще используются в фундаментальных исследованиях. Например, клетки, конститутивно экспрессирующие репрессор dCas9-KRAB или активатор dCas9-p300 соответственно, трансдуцировали библиотеками gRNA для скрининга предполагаемых дистальных регуляторных элементов и энхансеров, связанных с транскрипционными факторами [34]. Разработка gRNA для многих приложений CRISPR упрощена благодаря различным онлайн-ресурсам. Например, библиотека Brunello, состоящая из 77441 gRNA, в среднем 4 gRNA на ген и 1000 некодирующих

контрольных gRNA, была разработана для улучшения целевой активности при одновременном снижении нецелевых эффектов в геномах человека [35]. Одним из основных преимуществ CRISPRi/a является возможность объединения направляющих РНК для изучения работы отдельного гена, в то время как мультиплексирование направляющих РНК на разные гены позволяет одновременно репрессировать/активировать несколько генов для изучения сложных клеточных путей и сетей взаимодействия. Эти подходы могут оказаться чрезвычайно эффективными для разработки потенциальных лекарств [31], изучения некодирующих участков [36], анализа механизмов заболеваний человека в моделях ИПСК и их производных [37, 38].

Благодаря сочетанию передовых методов масштабных скринингов на основе CRISPR/Cas и высокопроизводительного секвенирования транскриптомов единичных клеток (scRNA-seq) возможно проводить анализ дифференциальной экспрессии генов и сравнивать транскриптомы из двух и более образцов [39]. Выполнение секвенирования на клетках с репрессией/ активацией гена-мишени на основе CRISPRi/a предоставляет информацию для подробного анализа транскриптомных последствий каждого изменения. Кроме того, с помощью инженерии эпигенома был разработан подход к систематическому измерению функции энхансера. Для этого линию клеток трансдуцировали лентивирусным вектором dCas9-KRAB-blast, содержащим мощный репрессор функции энхансера KRAB. После отбора селективным антибиотиком бластицидином клетки повторно трансдуцировали библиотекой gRNA на основе лентивирусного вектора, несущего штрих-код и пурамицин для второго раунда отбора. Выжившие клетки представляли собой эпигенетическую и транскриптомную мозаику: они экспрессировали различные sgRNA, способствуя направленным эпигенетическим изменениям и изменениям в экспрессии генов. Используя высокопроизводительную микрофлюидную платформу для секвенирования РНК одной клетки, каждый из полученных одноклеточных транскриптомов был упорядочен с определенным набором sgRNA с использованием последовательностей штрих-кода [40]. Главными параметрами данных исследований являются: количество целевых генов, выделение единичных клеток из гетерогенных тканей или культивируемых клеток, количество отсекуемых клеток и глубина секвенирования. Прежде чем начинать эксперимент по секвенированию транскриптомов единичных клеток, необходимо иметь референсный геном и транскриптом, на который будет происходить картирование данных scRNA-seq [41, 42].

Интеграция функциональной геномики на основе CRISPR и технологии стволовых клеток обеспечивает возможность масштабируемого исследо-

вания функции генов в дифференцированных клетках человека. В мире уже есть уникальные работы, посвященные полногеномному скринингу интерференции CRISPR и активации CRISPR в нейронах человека. В лаборатории Кампманна исследователи применили метод CRISPRi, чтобы изменить активность генов в нейронах человека, полученных из ИПСК. Анализ обнаружил гены, которые увеличивают количество отростков у нейрона, и гены, выключение которых повышает продолжительность жизни нейронов. Нокдаун определенных генов может оказывать разное влияние на выживаемость клеток и экспрессию генов в различных изогенных типах клеток человека, включая стволовые клетки и нейроны [43]. Нейроны, как один из наиболее долгоживущих типов клеток в организме человека, сталкиваются с различными стрессами при старении и болезнях. Из-за своей природы нейроны не обладают способностью “самообновляться” путем деления клеток. Следовательно, для поддержания здоровья нейронов в долгосрочной перспективе необходимы надежные механизмы реакции на стресс. Впервые были проведены первые полногеномные скрининги CRISPRi/a, нацеленные на 184 гена и 100 генов, соответственно, с использованием 2 gRNA на ген в человеческих нейронах. Значительный нокдаун или сверхэкспрессия гена были обнаружены для большинства мишеней в библиотеках. Эти скрининги выявили неожиданную роль лизосомального протеина просапозина (PSAP), нокдаун которого вызвал образование липофусцина, который улавливает железо, генерирует активные формы кислорода и запускает ферроптоз в нейронах. Интересно, что дефицит PSAP запускается только в нейронах, но не в ИПСК или клетках HEK293. Таким образом, что ингибирование образования липофусцина и последующего ферроптоза может служить новой терапевтической стратегией для лечения нейродегенеративных заболеваний. Исследователями была создана база данных под названием CRISPRbrain (<https://crisprbrain.org/>), объединяющая результаты генетических скринингов на различные фенотипы в разных типах клеток человека, проведенные различными исследовательскими группами. Это чрезвычайно ценный ресурс для сопоставления фенотипических данных, влияющих на нейродегенерацию [44].

#### ОГРАНИЧЕНИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЭПИГЕНОМА

Стремительный прогресс в области редактирования эпигенома с помощью CRISPR/Cas9 и привлекательность применения этой системы в терапевтических целях требуют разработки эффективных способов доставки эпиредкторов в различные популяции клеток и обеспечения высокоспецифичной активности импортированных

инструментов в области локуса-мишени. Выбранная система доставки в идеале должна обеспечивать тканеспецифичность и способность проникать в клетки-мишени, а также иметь низкую иммуногенность. На сегодняшний день конструкции для редактирования доставляются преимущественно с помощью электропорации, вирусных векторов и в виде рибонуклеарных комплексов. Первоначально многие конструкции на основе dCas9 доставлялись посредством электропорации плазмидной ДНК, но данная процедура токсична, поскольку она может повредить клеточную мембрану. Системы доставки генов на основе вирусных векторов уже широко используются в генной терапии [45]. Наиболее используемыми для доставки терапевтических конструкций являются лентивирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Лентивирусный вектор обладает большой упаковочной способностью (до 8500 п.о.) и характеризуется длительной экспрессией трансгена, он способен трансдуцировать неделящиеся клетки. Однако лентивирусный вектор является онкогенным и может вызывать вставку трансгена в геном хозяина, что в значительной степени ограничивает его использование [46]. Векторы на основе AAV могут доставляться в большое число самых разных тканей-мишеней, обладают низкой иммуногенностью, но имеют низкую емкость упаковки, что делает невозможным доставку большой конструкции эпиредактора [47]. Альтернативой векторам являются липидно-бислойные везикулы, полученные из аутологичных клеток, и, следовательно, имеющие низкую иммуногенность при доставке в клетку-мишень. Недостатком этих частиц является короткое время жизни по сравнению с вирусными конструкциями [48].

Значимым ограничением для применения в терапевтических целях редакторов эпигенома является потенциальная иммуногенность генно-инженерных белков. Иммуногенность конструкций, сшитых с TALE и dCas9 от низших организмов, еще не до конца исследована. Добавление эффекторных доменов, которые также получены от не млекопитающих (как, например, вирусного домена VP64), может усиливать потенциальную иммуногенность всей конструкции.

Внедрение усеченных gRNA, разработка более строгих требований к взаимодействиям PAM мотивов с сайтом мишени потенциально снизили вероятность нецелевых событий связывания dCas9, но ввиду того, что отследить нежелательное редактирование на уровне всего эпигенома крайне затруднительно, необходимо продолжить научные исследования [49].

По сравнению с традиционным методом РНК-интерференции (RNAi), репрессия генов на основе dCas9, слитых с KRAB, LSD1, может сни-

жаться до 99%, что эффективно используется в клеточной терапии *ex vivo*. Однако некоторые исследования показали, что эпигенетическое редактирование является только временным и обратимым, не приводя к стабильной “памяти” на это воздействие после удаления системы редактирования эпигенома [50, 51].

Полногеномный скрининг с последующим высокопроизводительным секвенированием транскриптомов единичных клеток является передовым методом, но тоже имеет свои ограничения. Поскольку транскриптом очень лабилен, а метод высокочувствителен, при сборе образцов следует помнить о влиянии различных факторов, включая стадию клеточного цикла. Другой проблемой, связанной с этим протоколом, является создание крупномасштабных библиотек CRISPR и необходимость культивирования огромного числа клеток для успешного скрининга многих нарушений экспрессии клеток. Важным условием является также отработка протоколов трансдукции лентивирусными векторами с библиотеками gRNA с высокой множественностью заражения. Высокопроизводительное разделение клеток при проведении скринингов с последующим секвенированием с применением флуоресцентных красителей может отрицательно влиять на жизнеспособность клеток. Селекция антибиотиками ограничивает применение метода только в пролифилирующих клетках. Необходимо также дорабатывать биоинформатические алгоритмы для верной интерпретации полученного массива данных [39].

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНОМА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Сайт-специфическое редактирование эпигенома предоставляет возможность изучить вклад нарушения генной регуляции в развитии того или иного заболевания, что позволит предложить новые терапевтические стратегии. Целевая активация “молчащих” генов или, наоборот, репрессия патологически активных генов могут смягчить симптомы, остановить прогрессирование или предотвратить развитие болезни. Такие подходы сегодня активно разрабатываются при нейродегенеративных заболеваниях.

При синдроме Ангельмана, ассоциированном с тяжелой умственной и физической отсталостью, активный материнский аллель гена нефункционален из-за мутации, тогда как отцовский аллель инактивирован. В 25% случаев заболевание ассоциировано с мутациями гена *UBE3A* в локусе 15q11–13. Белок *UBE3A* важен для всех клеток, особенно для нейронов головного мозга. Коррекция эпигенетического статуса одного или нескольких генов в районе 15q11–13 на хромосоме, полученной от матери, возможна с помощью направляющей гид-РНК и dCas9-DNMT3A. Было

доказано, что метилирование DNMT3A в клеточных линиях стабильно и сохраняется в процессе митозов [52]. В случае крупной делеции гена *UBE3A* на материнском аллеле возможный терапевтический подход заключается в удалении эпигенетических меток с отцовского аллеля.

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное дегенеративное заболевание, в развитии которого велика роль генетических факторов [53]. Основные двигательные проявления БП связаны с гибелью дофаминергических нейронов в области чёрной субстанции среднего мозга, и направленная активация компенсаторных генов может смягчить симптомы заболевания. Например, активация экспрессии эндогенного глиального фактора роста нервов (GDNF) с помощью конструкции AAV-ZFN-p65 в “паркинсонической” клеточной линии крыс RIN-m5F показала многообещающие результаты с позиций нейропротекции, что дает новые возможности лечения нейродегенерации, связанной с БП [54].

Мутация гена *SNCA*, расположенного на хромосоме 4q21–22 и кодирующего белок альфа-синуклеин, обуславливает развитие моногенной формы БП с аутосомно-доминантным типом наследования. Повышение экспрессии и нарушение процессинга данного белка являются центральным звеном молекулярного патогенетического каскада, ведущего к накоплению в клетке нерастворимых белковых комплексов и прогрессирующей дегенерации дофаминергических нейронов. Используя технологию редактирования эпигенома с применением дезактивированного Cas9 (dCas9), слитого с каталитическим доменом ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A), в дофаминергических нейронах из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента с трипликацией *SNCA*, удалось целенаправленно метилировать CpG-динуклеотиды в первом интроне и уменьшить уровень экспрессии мутантного гена. Kantor et al. [55] предположили, что редактирование эпигенома при помощи технологией CRISPR-dCas9 можно рассматривать в качестве нового перспективного терапевтического подхода для лечения БП.

Синдром ломкой X-хромосомы характеризуется умственной отсталостью разной степени выраженности и встречается у обоих полов, но мужчины-гемизиготы страдают этим заболеванием чаще и значительно тяжелее. Генетической основой данного заболевания является увеличение числа CGG-повторов в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1* с последующим метилированием промотора и инактивацией экспрессии белка FMRP [56]. FMRP является РНК-связывающим белком, который играет первичную роль в качестве репрессора трансляции различных мРНК, многие из которых участвуют в формировании и поддержании нейрональной синаптической функции и пластичности.

В ИПСК пациента с синдромом ломкой X-хромосомы с помощью конструкции gRNA dCas9-TET1 сняли метилирование в повторах и восстановили постоянную экспрессию *FMR1* в клетках. В нейронах, полученных из отредактированных ИПСК, был успешно восстановлен здоровый фенотип [56].

Болезнь Гентингтона (БГ) – тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется нарастающим хореическим гиперкинезом, деменцией, психопатологическими расстройствами. Мутация в первом экзоне гена *HTT*, обусловленная экспансией тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых (CAG) повторов, приводит к синтезу мутантного белка гентингтина, который оказывает многофакторное цитотоксичное действие на нейроны полосатого тела [57]. Доставка с помощью аденовирусных векторов химерного белка ZFN-KRAB, используемого для подавления экспрессии гена *HTT*, приводила к значительному снижению уровня экспрессии мутантной РНК и белка гентингтина в мозге мышей линии R6/2, служащих моделью БГ [58].

Репрессоры на основе программируемых редакторов, способные подавлять экспрессию мутантных генов, могут являться перспективным инструментом в отношении и других мишеней при различных нейродегенеративных заболеваниях из группы церебральных протеинопатий, сопровождающихся гиперпродукцией аномально конформированных клеточных белков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие системы CRISPR/Cas9 ознаменовало революцию в области генетического и эпигенетического редактирования. Создание нуклеазодефектных Cas9 привело к разработке различных производных CRISPR/dCas9, которые могут быть использованы для выполнения различных функций, таких как отслеживание, активация и репрессия транскрипции и редактирование. До недавнего времени эпигенетические исследования основывались только на корреляциях между некоторыми эпигенетическими модификациями и регуляцией функции генов (то есть активацией или молчанием). Редактирование эпигенома сейчас позволяет непосредственно изучить функциональную значимость определенной эпигенетической модификации в определенном локусе или области генома. Использование редактирования эпигенома и управление эпигенетическими метками с помощью света, являются перспективным для геномной и эпигеномной терапии. Однако чтобы сделать редактирование эпигенома безопасным для терапевтических целей, необходимо дальнейшее усовершенствование эффективной и неиммунной доставки редактора с последующей устойчивой активностью. И хотя “tag-off” эффект от действия эпиредкторов может показаться менее

вредным по сравнению с редактированием генов системой CRISPR/Cas9, важно сделать редактирование эпигенома как можно более точным из-за отсутствия полных знаний о регулировании эпигенома. Исследование редакторов эпигеномов на настоящий момент направлено на преодоление этих проблем и, возможно, откроет новые возможности для лечения нейродегенеративных и других заболеваний человека.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Е.А., Мелино Д., Барлев Н.А. // Цитология. 2015. Т. 57. № 1. С. 19–30.
2. Ветчинова А.С., Коновалова Е.В., Лунев Е.А., Иллариошкин С.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2015. Т. 9. № 4. С. 59–64.
3. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // Science. 2012. V. 337. P. 816–821.
4. Thakore P., Black J., Hilton I., Gersbach P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 127–137.
5. Maston G.A., Evans S.K., Green M.R. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2006. V. 7. P. 29–59.
6. Грин И.П., Петрова Д.В., Жарков Д.О. // Гены и клетки. 2016. № 2. С. 53–60.
7. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C. // Nat. Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 636–646.
8. Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B., Barbas C.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14628–14633.
9. Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G.M., Arlotta P. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. P. 149–153.
10. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Höning K., Hornung V. // Nat. Biotechnol. 2013. P. 31. P. 76–81.
11. Maeder M.L., Angstman J.F., Richardson M.E., Linder S.J., Cascio V.M., Tsai S.Q., Ho Q.H., Sander J.D., Reyon D., Bernstein B.E., Costello J.F., Wilkinson M.F., Joung J.K. // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 1137–1142.
12. Chen H., Kazemier H.G., de Groot M.L., Ruiters M.H., Xu G.L., Rots M.G. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 1563–1574.
13. Jinek M., Jiang F., Taylor D., Sternberg S., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A., Charpentier E., Nogales E., Doudna J. // Science. 2014. V. 343. P. 1247997.
14. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang F. // Nature. 2013. V. 500(7463). P. 472–476.
15. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J., Yuen Chen Y., Evan H., Whitehead E., Guimaraes C., Panning B., Ploegh H., Bassik M., Qi L., Kampmann M., Jonathan S., Weissman J. // Cell. 2014. V. 159. P. 647–661.
16. Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B., Tuttle M., Iyer E., Shuailiang Lin S., Kiani S., Guzman C., Daniel J., Wiegand D., Ter-Ovanesyan D., Braff J., Davidsohn N., Housden B., Perrimon N., Ron Weiss R., John Aach J., Collins J., Church G. // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 326–328.
17. Zhang Y., Yin C., Zhang T., Li, F., Yang W., Kaminski R., Fagan P.R., Putatunda R. Young W.-B., Khalili K. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16277–16291.
18. Polstein L.R., Gersbach C.A. // Nat. Chem. Biol. 2015. V. 11. P. 198–200.
19. Yeo N., Chavez A., Lance-Byrne A., Chan Y., Menn D., Milanova D., Kuo C., Guo X., Sharma S., Tung A. // Nat. Methods. 2018. V. 15. P. 611–617.
20. Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A. // Nat. Biotechnol. 2015. V. 33. P. 510–517.
21. Moreno A.M., Fu X., Zhu J., Katrekar D., Shih Y.V., Marlett J., Cabotaje J., Tat J., Naughton J., Lisowski L. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 1818–1827.
22. Xu X., Hulshoff M., Tan X., Zeisberg M., Zeisberg E.M. // Int. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 3038–3048.
23. Kearns N.A., Pham H., Tabak B., Genga R.M., Silverstein N.J., Garber M., Maehr R. // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 401–403.
24. O'Geen H., Bates S.L., Carter S.S., Nisson K.A., Halmaj J., Fink K.D., Rhie S.K., Farnham P.J., Segal D.J. // Epigenetics Chromatin. 2019. V. 12. P. 26–46.
25. Vojta A., Dobrinic P., Tadic V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 5615–5628.
26. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y. // Cell. 2013. V. 154. P. 1380–1389.
27. Fu Y., Rocha P.P., Luo V.M., Raviram R., Deng Y., Mazzoni E.O., Skok J.A. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11707–11715.
28. Pflueger C., Tan D., Swain T., Nguyen T., Pflueger J., Nefzger C., Polo J., Ford E., Lister R. // Genome Res. 2018. V. 28. P. 1193–1206.
29. Choudhury S., Cui Yi., Lubecka K., Stefanka B., Irudayaraj J. // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 46545–46556.
30. Zhou H., Liu J., Zhou C., Gao N., Rao Z., Li H., Hu X., Li C., Yao X., Shen X. // Nat. Neurosci. 2018. V. 21. P. 440–446.
31. Brezgin S., Kostyusheva A., Kostyushev D., Chulanov V. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6041–6067.
32. Chavez A., Tuttle M., Pruitt B.W., Ewen-Campen B., Chari R., Ter-Ovanesyan D., Haque S.J., Cecchi R.J., Kowal E.J.K., Buchthal J. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 563–567.
33. Russa M., Qi L. // Mol. Cell Biol. 2015. V. 35. P. 3800–3809.
34. Klann T., Black J., Chellappan M., Safi A., Song Hilton I., Crawford G., Reddy T., Gersbach C. // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. P. 561–568.
35. Doench J., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E., Donovan K., Smith I., Tothova Z., Craig Wilen C., Or-



- chard R., Virgin H., Listgarten J., Root D. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 2. P. 184–191.
36. Jounq J., Konermann S., Gootenberg J., Abudayyeh O., Randall J., Platt R., Mark D., Brigham M., Sanjana N., Zhang F. // Nat. Protoc. 2017. V. 12. P. 828–863.
37. Black J., Gersbach C.A. // Curr. Opin. Genet. 2018. V. 52. P. 13–21.
38. Ho S., Hartley B., Flaherty E., Rajarajan. P., Abdelaal R., Obiorah I., Barretto N., Muhammad H., Phatnani H., Akbarian S., Brennand K. // Stem Cell Reports. 2017. V. 9. P. 615–628.
39. Datlinger P., I, André F., Rendeiro A., Schmidl C., Krausgruber K., Traxler P., Klughammer J., Schuster L., Kuchler A., Alpar D., Bock D. // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 297–301.
40. Xie S., Duan J., Li B., Zhou P., Hon G. // Mol. Cell. 2017. V. 66. P. 285–299.
41. Pei W., Hill A., McFaline-Figueroa J., Starita L., Gasperini, M., Matreyek K., Packer J., Jackson D., Shendure J., Trapnell C. // Nat. Methods, 2018. V. 15. P. 271–274.
42. Adamson B., Norman T.M., Jost M., Cho M., Nuñez D., Chen Y., I, Villalta J., Gilbert L., Horlbeck M., Hein M., Pak R., Gray A., Gross C., Parnas O., Regev A., Weissman J. // Cell. 2016. V. 167. P. 1867–1882.
43. Tian R., Gachechiladze M., Ludwig C., Laurie M., Hong J., Nathaniel D., Prabhu A., Fernandopulle M., Patel R., Abshari M., Ward M., Kampmann M. // Neuron. 2019. V. 104. P. 239–255.
44. Tian R., Abarientos A., Hong J., Hashemi S.H., Yan R., Dräger N., Leng K., Nalls M.A., Singleton A.B., Xu K., Faghri F., Kampmann M. // 2020 preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.27.175679>
45. Naso M.F., Tomkowicz B., Perry W.L., Strohl W.R. // BioDrugs. 2017. V. 31. P. 317–334.
46. Vogt S., Stadlmayr G., Grillari J., Rümer F., Wozniak-Knopp G. // Current Topics Biochem. Eng. 2019. V. 29. P. 83537–83581.
47. Moreno A.M., Fu X., Zhu J., Katrekar D., Shih Y.V., Marlett J., Cabotaje J., Tat J., Naughton J., Lisowski L. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 1818–1827.
48. Tadie V., Josipovic G., Zoldos Z., Vojta V. // Methods. 2019. V. 164. P. 109–119.
49. Kishino T., Lalonde M., Wagstaff J. // Nat. Genet. 1997. V. 15. P. 70–73.
50. Braun C.J., Bruno P.M., Horlbeck M.A., Gilbert L.A., Weissman J.S., Hemann M.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. E3892–E3900.
51. Syding L., Nickl P., Kasperek P., Sedlacek R. // Cell. 2020. V. 9. P. 993–1018
52. Liao J.R., Karnik H., Gu M., Ziller M., Clement K., Tsankov A., Akopian V. // Nature. 2015. V. 5. P. 469–478.
53. Wang S.E., Jiang Y. // Trends Pharmacol. Sci. 2019. V. 40. P. 605–608.
54. Иллариошкин С.Н., Загоровская Т.Б., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. // Неврологический журн. 2002. № 5. С. 47–51.
55. Laganier J., Kells A., Jeffrey T., Guschin D., Paschon P., Meng X., Fong L., Yu Qi., Rebar E., Gregory P., Bankiewicz K., Forsayeth J., Zhang H.S. // J. Neurosci. 2010. V. 30. P. 16469–16474.
56. Kantor B., Tagliafierro L., Gu J., Madison E., Zamora M., Ilich E., Grenier C., Huang Z., Murphy S., Chiba-Falek O. // Mol. Ther. 2018. V. 26. P. 2638–2649.
57. Liu X., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X., Czauderna S., Shu J., Dadon D., Young R., Jaenisch R. // Cell. 2018. V. 167. P. 233–247.
58. Bates G.P., Mangiarini L., Mahal A., Davies S.W. // Hum. Mol. Genet. 1997. V. 6. P. 1633–1637.
59. Garriga-Canut M., Agustin-Pavon C., Herrmann F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 3136–3145.
60. Tahiliani M., Koh K., Shen Y., Pastor W., Bandukwala H., Brudno H., Agarwal S., Iyer L., Liu D., Aravind L., Rao A. // Science. 2009. V. 324. P. 930–935.

## Editing the Epigenome in Neurodegenerative Diseases

A. S. Vetchinova<sup>a</sup>, E. Yu. Fedotova<sup>a</sup>, and S. N. Illarioshkin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Directed genomic editing using the CRISPR/Cas9 system, introduced into practice in recent years and becoming one of the most impressive achievements of modern molecular biology, makes it possible to efficiently correct genetic information at the cell level. For therapeutic purposes, it is important to make rapid and precise changes in the nucleotide sequence of the genome *in vivo*. And if editing genes includes changing the DNA nucleotide sequence itself and direct correction of genetic information, then epigenetic editing is aimed at controlling the expression of certain genes, primarily by changing the methylation status of specified sites in the genome. By editing epigenomic traits in this way, researchers can determine the exact biological role of epigenetic modification in the development of a particular pathology. The review presents the fundamental and technological foundations of epigenomic editing, as well as the current capabilities of this advanced technology in the study of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** epigenetics, regulation of gene activity, methylation, CRISPR/Cas9, neurodegenerative diseases