
ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ МОЗГА
ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ ИНСТРУМЕНТАМИ

© 2019 г. Н. Н. Дыгало*

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

**E-mail: dygalo@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 08.06.2019 г.

После доработки 22.07.2019 г.

Принята к публикации 22.07.2019 г.

Методы, базирующиеся на генетически кодируемых молекулярных конструкциях, такие как антисенс-нокдаун и РНК-интерференция, изменяющие экспрессию целевых генов, широко используются для анализа функции кодируемых этими генами белков, а также находят применение в медицинской практике. С помощью этих методов, например, было установлено, что даже кратковременное снижение экспрессии одного из рецепторов норадреналина в критический период развития мозга оставляет длительный след на нейрохимическом и поведенческом уровнях в последующей жизни. Доставка в клетки мозга вирусных конструкций, кодирующих какие-либо белки, влияющие на функции клетки, или малые шпилечные РНК (shRNA), снижающие экспрессию целевого гена, также находит применение в нейробиологии. Ярким проявлением мощи генетически кодируемых инструментов в исследованиях центральной нервной системы, инструментов, потенциально пригодных для управления активностью клеток мозга с терапевтическими целями, являются оптогенетика и хемогенетика. Оба подхода реализуются путем экспрессии в желаемом типе клеток новых для организма рецепторов, реагирующих на свет определенной длины волны или несвойственную для организма химическую молекулу лиганда. Эти подходы позволяют оценить функциональные последствия изменения активности специфической популяции нейронов, что обеспечило, например, существенный прогресс в расшифровке механизмов центральной регуляции поведения. Так, с помощью оптогенетики обнаружено, что активация глутаматергических нейронов дорзального гиппокампа индуцирует депрессивно-подобное поведение, а антидепрессантный эффект кетамина на это поведение осуществляется прямым действием препарата на NMDA-рецепторы. Разработанные в последние несколько лет методы редактирования генома и управления экспрессией генов на основе бактериальных CRISPR/Cas систем уже используются для изучения функции мозга. В настоящее время на модельных объектах с оптимистическими ожиданиями разрабатываются возможные способы применения опто- и хемогенетики, а также CRISPR/Cas технологий в медицине.

Ключевые слова: антисенс-нокдаун, РНК-интерференция, оптогенетика, хемогенетика, редактирование генома, управление экспрессией генов

DOI: 10.1134/S0869813919110049

Обширные сведения, полученные в последние десятилетия, о структуре генома человека и уже многих видов млекопитающих существенно расширили возможно-

Таблица 1. Генетически кодируемые инструменты

1.	Олигонуклеотиды:
	а. антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (ASO)
	б. короткие интерферирующие РНК (siRNA)
2.	Вирусные векторы, кодирующие:
	а. генетически активные олигонуклеотиды
	б. белки
	в. компоненты системы CRISPR/Cas9
	г. фото- и хемочувствительные белки, влияющие на активность клетки

сти исследования их наиболее сложно организованного органа – головного мозга. Появилась возможность создания тысяч генетических линий животных, моделирующих, в том числе и в головном мозге, постоянное или возникающее при специфической индукции отсутствие или, наоборот, увеличение экспрессии интересующего исследователя гена, соответственно конститутивные или кондиционные нокауты (knockout) или нокины (knockin). Использование подобных моделей, наряду с линиями трансгенных животных, экспрессирующих генетические регуляторные механизмы, отсутствующие в геноме млекопитающих, такие как, например, Tet-off, Tet-on [1] или Cre-lox системы [2], обусловлено специфическими особенностями их генотипов, создаваемых исследователями. В отличие от моделей генетические инструменты – экзогенные генетические конструкции, ряд которых перечислен в табл. 1 и далее будет представлен в обзоре, применимы как к генетически модифицированным линиям, так и к организмам, не несущим каких-либо специальных трансформаций их генома, в том числе и к человеку. Последнее позволяет рассматривать возможность использования таких инструментов не только в исследовательских, но и в медицинских целях.

Доставка генетически кодируемых инструментов в клетку. Важной, а возможно и ключевой проблемой применения инструментов, перечисленных в табл. 1, с любой целью является необходимость их доставки в клетку, что особенно затруднено в случае с клетками мозга. Для облегчения поступления в клетки относительно простых, так называемых “голых” олигонуклеотидных конструкций, нуклеотиды подвергают разнообразным химическим модификациям [3]. На их основе создают различные мультимолекулярные комплексы [4], в том числе, например, и путем сшивки олигонуклеотидов с биodeградебельными полимерами, захватываемыми клетками [5]. Используются физические воздействия (электропорация, сонификация, магнитные наночастицы), способствующие эндоцитозу или обратимым изменениям в плазматической мембране клетки, позволяющим прямой проход генетических конструкций в клетку [6].

Более сложными генетическими инструментами по сравнению с олигонуклеотидными конструкциями являются плазмиды и вирусные векторы, способные запустить экспрессию в самой клетке эффектора, необходимого для воздействия на ее функцию. Плазмиды, как более крупные по размеру, уступают олигонуклеотидам по способности проникать в клетку. Поэтому для доставки плазмид в клетки центральной нервной системы (ЦНС) используют их введение в мозг и, как правило, с последующей электропорацией, что особенно успешно в период эмбриогенеза и первых дней жизни лабораторных грызунов [6, 7].

Вместе с тем, как для простых олигонуклеотидных конструкций, так и для вирусных векторов, нацеливаемых на функции клеток мозга, пока еще трудно пре-

одолимой преградой является гемато-энцефалический барьер. В экспериментальных работах это препятствие обходят прямым стереотаксическим введением того или иного генетического инструмента непосредственно в желаемую область мозга [6]. В клинических случаях, когда риск осложнений от введения вектора в мозг намного меньше, чем от патологического процесса, на предотвращение или ослабление которого нацелен вектор, также описано применение стереотаксических инъекций. Так, I/II фазу проходит исследование эффективности лечения болезни Паркинсона введением в мозг аденоассоциированного вируса (AAV), кодирующего декарбоксилазу ароматических L-аминокислот человека [8].

Проблема доставки генетических инструментов в клетки мозга интенсивно исследуется. Полученные результаты анализируются в многочисленных современных обзорах [например, 4, 6]. Эта заслуживающая специального рассмотрения проблема, к сожалению, далека от решения. Несмотря на это, преодолевая затруднения, перечисленные выше и ряд других, например, обусловленные нуклеазной деградацией олигонуклеотидов или необходимостью обеспечения экспрессии вектора в желаемом типе клеток, наиболее популярные генетически кодируемые инструменты, перечисленные в таблице, уже использованы в тысячах исследованиях функции мозга, индексированных в базе Web of Science.

1. Олигонуклеотиды. Одноцепочечные антисмысловые к участку мРНК-мишени олигодезоксинуклеотиды (антисенс-технология) или короткие двухцепочечные РНК, одна из цепей которой также комплементарна к участку мРНК (РНК-интерференция) позволяют сиквенс-специфически снизить уровень экспрессии целевого гена — его нокдаун (knockdown).

1.а. Антисмысловой олигодезоксинуклеотид (ASO). Антисенс-технологии как минимум четверть века, и снижение экспрессии генов с ее применением осуществлено в более чем в 3000 работах, присутствующих в базе данных PubMed. ASO представляет собой короткий аналог ДНК, как правило, несущий химические модификации, защищающие его от деградации нуклеазами. ASO сиквенс-специфически гибридизуется с комплементарной мРНК по правилу спаривания оснований Уотсона—Крика. Гетеродуплекс ASO—мРНК активирует РНКазу H, разрушающую мРНК и сам ASO. Формирование дуплекса также способно индуцировать остановку трансляции за счет стерического препятствия работе рибосомы. Кроме того, оно дестабилизирует пре-мРНК в ядре, что приводит к понижающей регуляции экспрессии белка, кодируемого мРНК-мишенью, а также нарушает созревание мРНК путем ингибирования сплайсинга, что, как и снижение экспрессии гена-мишени, может быть использовано в терапевтических целях. Следует отметить, что эффективная работа ASO достигается лишь при соблюдении при его конструировании правил выбора последовательности нуклеотидов, осуществляемого на основе учета вторичной структуры мРНК-мишени, а также предпочтительного состава и порядка нуклеотидов в сегменте, гибридизующимся с ASO [8, 9]. В сотнях исследований антисенс-технология успешно использовалась для выяснения механизмов регуляции физиологических функций и поведения. Например, введение в область скопления норадренергических нейронов в стволовой части головного мозга взрослых самцов крыс ASO к мРНК альфа2A-адренорецептора снижало уровень этого транскрипта и количество рецепторов в мозге, т.е. его экспрессию, что сопровождалось ослаблением проявлений тревожности и повышением внимания животных к особям противоположного пола [11].

Возможность использования ASO в терапевтических целях также активно исследуется во множестве клинических испытаний различных стадий, о которых сообщается в более чем 250 публикациях, представленных в базе PubMed. Однако лишь очень небольшая часть этих публикаций касается нервной системы, что вполне объяснимо весьма ограниченной возможностью доставки генетически ко-

дируемых инструментов в головной мозг имеющимися в настоящее время способами. В связи с этим, пока единственный олигонуклеотидный препарат Nusinersen, одобренный для использования в США, нацелен на нормализацию функции моторных нейронов спинного мозга, дегенерирующих в результате мутации в гене жизнеспособности этих нейронов (*SMN1*) при спинальной мышечной атрофии. Имеющийся у человека ген *SMN2* функционален у всех пациентов, но содержит замену С-на-Т в 7-ом экзоне, которая обуславливает удаление этого экзона из большинства транскриптов гена *SMN2*, что приводит к синтезу нестабильного белка, неспособного компенсировать мутацию в основном гене *SMN1*. Антисмысловый олигонуклеотид Nusinersen при интратекальном введении обеспечивает включение экзона 7 в большинство мРНК *SMN2* и, как следствие, выработку полнофункционального белка SMN, предотвращающего гибель мотонейронов [12, 13].

1.6. Короткая интерферирующая РНК (siRNA). Обнаружение в 2001 г. принципиальной возможности использования механизма РНК-интерференции для сивенспецифического снижения экспрессии генов в клетках млекопитающих [14] открыло новые перспективы для исследования функции генов млекопитающих, в том числе и в их головном мозге. РНК-интерференция – процесс ген-сайленсинга, в котором короткая (обычно 21 п.н.) двухцепочечная РНК вызывает гомологично-зависимую деградацию мРНК-мишени с участием индуцируемого РНК комплекса белков ген-сайленсинга (RISC – RNA Inducible Silencing Complex), в который включена антисмысловая к мишени цепь siRNA [15]. Молекулярные особенности функционирования этого эндогенного для клеток млекопитающих комплекса определяют предпочтительный размер siRNA, антисмысловая цепь которой – комплементарная к участку мРНК-мишени, адресует RISC на связывание с мишенью, разрезаемую нуклеазой комплекса. Сам комплекс, в отличие от ASO, при этом сохраняет свою целостность и активность. Поэтому однократное применение siRNA приводит к более продолжительному, чем ASO, снижению уровня мРНК мишени, которое при соблюдении правил конструирования эффективных siRNA [15] в зависимости от транскрипционной активности гена-мишени и стабильности его белка способно понижать уровень этого белка на протяжении нескольких дней. РНК-интерференция уже успешно применялась в тысячах исследованиях ЦНС и поведения.

Кроме установления функций исследуемых генов и кодируемых ими белков во взрослом мозге, siRNA предоставляет возможность анализа последствий сравнительно непродолжительного нарушения экспрессии нейрогена в критические сроки онтогенеза для нейрофизиологических и поведенческих свойств организма в последующие периоды жизни. В одном из первых исследований кратковременное снижение уровней мРНК и белка альфа2А-адренорецепторов с помощью короткой интерферирующей РНК в мозге новорожденных крысят приводило в дальнейшем, во взрослом состоянии, к повышению плотности этих рецепторов в ряде отделов мозга, что сопровождалось аномальным для грызунов снижением их тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте [16]. Применение siRNA позволило обнаружить, что даже кратковременное изменение экспрессии гена рецептора нейротрансмиттера в критический период развития мозга может приводить к продолжительному нарушению нейрохимии и поведения. Значение этого впервые выявленного механизма определяется способностью обычных факторов раннего онтогенеза, таких, как стресс, терапия или качество материнской заботы, индуцировать изменения в экспрессии нейрогенов, подобные действию РНК-интерференции и, следовательно, предрасполагать к развитию психопатологии в последующие периоды жизни [17].

Наряду с фундаментальными исследованиями проводятся обширные доклинические и клинические испытания возможности применения РНК-интерференции

в ЦНС с терапевтическими целями. Естественной мишенью такой терапии могут быть опухоли мозга, в которые при хирургическом вмешательстве может быть введена siRNA [18]. С низкой доступностью мозга для siRNA связано нацеливание единственной недавно одобренной небольшой интерферирующей РНК, Patisiran (ALN-TTR02), на лечение периферической нейропатологии — аутосомно-доминантной семейной амилоидной полинейропатии. При этом заболевании происходит отложение амилоида в периферических нервах с последующей прогрессирующей нейродегенерацией и необратимым ухудшением неврологических функций [19].

2. Вирусные векторы. Вирусные векторы способны в самой клетке запустить экспрессию эффектора, необходимого для воздействия на ее функцию. Для этого применяются разнообразные вирусы, например, ленти-, ретро-, адено-, аденоассоциированные (AAV), а также и некоторые другие вирусы [20]. Каждый из типов вирусных векторов имеет определенные преимущества и ограничения, которые делают их более или менее подходящими для конкретного исследования. Для экспрессии генетически кодируемых инструментов в ЦНС предпочтительным вариантом считаются AAV благодаря их минимальной токсичности, очень низкой скорости интеграции в геном [21] и способности трансфицировать как делящиеся, так и постмитотические клетки. Адресация действия вирусного вектора в определенном типе клеток осуществляется преимущественно за счет избирательной активности в клетках-мишенях промотора гена, кодируемого вектором. Вектор стереотаксически вводится в желаемую структуру головного мозга на необходимой стадии онтогенеза, поэтому он не влияет на предшествующие стадии развития. Во многих исследованиях вирусные векторы используются в комбинации с трансгенными животными, преимущественно имеющими механизм Cre/loxP рекомбинации [22, 23]. В этом случае векторы обеспечивают работу кодируемых ими генетических конструкций только в клетках с Cre-рекомбиназой. В настоящее время имеются сотни Cre-рекомбиназных линий мышей, способных обеспечить избирательную экспрессию вектора в разных структурах головного мозга и типах его клеток [2, 24]. С помощью вирусных векторов в клетках, в том числе и в клетках нервной системы, могут быть наработаны разнообразные генетически кодируемые инструменты, как снижающие, так и повышающие экспрессию исследуемого белка, избирательно регулирующие активность клеток управляемыми исследователем стимулами, маркирующие цепочки взаимодействующих нейронов, редактирующие геном, а также контролирующие экспрессию генов. Некоторые из этих применений вирусных векторов рассмотрены ниже.

2.а. Генетически активные олигонуклеотиды. Последовательности, кодирующие два типа олигонуклеотидов: короткие шпилечные РНК (shRNAs) и искусственные микроРНК (miRNAs), могут быть доставлены в клетки вирусным вектором с целью снижения экспрессии гена-мишени. shRNAs и miRNAs действуют с помощью РНК-интерференции, но включаются в этот механизм на разных стадиях его реализации. В отличие от shRNAs, miRNAs нуждаются во внутриядерной стадии превращения перед экспортом в цитоплазму, в которой эти молекулы активируются рибонуклеазой DICER [25] и далее могут быть включены в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC). Этот комплекс распознает мРНК-мишень и либо репрессирует трансляцию в случае частичной комплементарности мишени, либо индуцирует расщепление мРНК в случае полной комплементарности. Повышенные количества shRNAs, которые обычно нарабатываются под контролем сильных промоторов полимеразы III, могут вызывать насыщение и блокаду эндогенного механизма РНК-интерференции, обуславливая токсичность этих инструментов из-за конкуренции между эндогенными и экзогенными молекулами. Переключение контроля экспрессии shRNA/miRNAs на более слабый промотор ДНК-полимера-

зы II позволяет снизить их продукцию и, тем самым, токсичность. Хотя молекулы нацеливаются на определенные мРНК, тем не менее, могут наблюдаться нецелевые эффекты из-за неспецифического связывания со сходными по сиквенсу транскриптами, которые должны учитываться в процессе конструирования этих генетически кодируемых инструментов [26].

2.б. Белки. Вирусные векторы используются в качестве средства доставки в клетки генетических конструкций, кодирующих как терапевтические, так и потенциально токсичные или патогенные белки. Высокая экспрессия трансгенного белка обнаруживается в мозге даже после длительных периодов времени после вирусной трансдукции, что делает этот метод мощным инструментом для создания моделей заболеваний и их терапии. Наряду с самим вектором, важным аспектом, например, нейротрофической терапии болезни Паркинсона является необходимость учета свойств мишени – дофаминовых нейронов черной субстанции, для выбора области введения AAV, кодирующего тот или иной терапевтический белок, – в полосах тело или черную субстанцию [27]. Имеются также данные о неспецифических реакциях и даже гибели клеток-мишеней из-за сверхэкспрессии белка, и поэтому использование таких белков в исследованиях нейродегенерации необходимо тщательно контролировать [27]. В связи с этим способность модулировать экспрессию трансгена имеет решающее значение для применения вирусных векторов в клинике [28]. С целью регуляции экспрессии трансгена в эукариотических клетках, в том числе и в клетках мозга, используются, например, контролируемые тетрациклином системы Tet–Off и Tet–On [1, 29]. Эти системы основаны на регуляторных элементах, которые контролируют в бактериях активность оперона устойчивости к тетрациклину. Система Tet–Off позволяет подавлять экспрессию генов после введения тетрациклина или его аналогов, таких как доксициклин, а система Tet–On позволяет активировать экспрессию генов посредством этих же препаратов. Такие системы регуляции активности генов могут быть встроены в вектор. Они широко применяются как в фундаментальных биологических исследованиях, так и в биотехнологии и генной терапии. Следует, однако, отметить, что сам доксициклин оказывает влияние на функции мозга [30], и его собственные эффекты необходимо контролировать. В клинике для терапии болезни Паркинсона исследовалась доставка с помощью AAV в мозг человека трех генов, кодирующих белки: фермента преобразования L-дофа в дофамин декарбоксилазу ароматических L-аминокислот человека в путамен [8], фермента синтеза GABA глутаматдекарбоксилазу в субталамическое ядро, демонстрирующее у пациентов высокую активность, а также нейротурин, обеспечивающего нейротрофическую поддержку, в нигростриатный тракт. Эти клинические испытания показали безопасность доставки AAV в мозг человека, однако, терапевтические эффекты были скромными [28].

2.в. Компоненты системы CRISPR/Cas9. (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы)/CRISPR associated protein 9 – ассоциированный с CRISPR белок 9, который является эндонуклеазой, управляемой направляющей РНК). Бактериальная система CRISPR/Cas9 защищает клетку прокариот от проникновения в них чужеродной ДНК. Эта система нацеливается на ген-мишень фрагментом направляющей РНК (guide-RNA), включаемой в CRISPR/Cas9 комплекс. Эта РНК обеспечивает взаимодействие системы CRISPR/Cas9 с целевым участком в геномной ДНК, длиной в среднем 20 п.н. по правилу комплементарного спаривания оснований, а каталитически активная нуклеаза Cas9 делает в этом месте двунитевой разрыв ДНК, который может быть использован для изменения структуры гена в необходимом направлении. Это свойство стало основой для создания на базе системы CRISPR/Cas9 инструментов редактирования генома как митотических клеток, так и зрелых постмитотических нейронов *in vitro* и *in vivo* [31], позволяющих

внесение модификаций в целевые гены для изучения их функций, генных сетей в мозге, а также моделировать различные патологические состояния без получения новых линий животных с модифицированным геномом.

Для функционирования CRISPR/Cas9 необходима экспрессия в клетке как белка Cas9, так и направляющей РНК. Большие для AAV-векторов размеры CRISPR/Cas9-системы, стимулировали разработку минимизированных конструкций на основе цитомегаловирусных векторов для эффективной доставки нуклеазы и направляющей РНК [32]. Для преодоления ограничений, диктуемых емкостью AAV-векторов, они могут использоваться парой: отдельно для Cas9 и для sgRNA (single guide RNA) [33]. Следует также отметить возможность нецелевой активности CRISPR/Cas9-нуклеаз, что необходимо учитывать при планировании использования этой системы [34]. Несмотря на перечисленные сложности, эта система активно используется как в фундаментальных, так и доклинических исследованиях, в том числе и функций головного мозга.

Например, доставка генетических конструкций, кодирующих элементы CRISPR/Cas9, нацеленные на ген субъединицы GluN1 NMDA-рецептора, в мозг эмбриона мыши привела к нокауту этого рецептора и к уменьшению соотношения NMDA/AMPA рецепторных токов [35]. Наряду с изменением структуры генов, создание каталитически неактивной dCas9, лишенной нуклеазных доменов, обеспечило появление инструментов для контроля экспрессии генов, маркировки специфических нуклеотидных последовательностей в мозге с высокой специфичностью и эффективностью. Не разрезающая ДНК dCas9, тем не менее, адресуется на участки генома, комплементарные направляющей РНК, и действует как якорная система для присоединенных к ней разнообразных белков. В качестве таких белков могут быть, например, активаторы или репрессоры транскрипции [36, 37], маркерные флуоресцентные белки, а также иные эффекторы, влияющие на структуру и функцию ДНК в районах, прилегающих к участкам генома, комплементарным направляющей РНК [38]. Универсальность и относительная простота системы CRISPR позволяет использовать ее для разнообразных целей, в их числе и для анализа транскрипционных и эпигенетических механизмов. С помощью этой системы ожидается углубление понимания генетических и эпигенетических основ нейрональной пластичности, поведения и психоневрологических расстройств.

2.г. Фото- и хемочувствительные белки, влияющие на активность клетки. Первая однокомпонентная система, способная при воздействии света изменять активность нейрона [39], была создана в 2005 г. и через год был предложен термин “Оптогенетика” (Optogenetics). Через несколько лет был создан еще один подход изменения активности нейрона в желаемом направлении с помощью воздействия химическим лигандом — “Хемогенетика” (Chemogenetics) [40]. Принципы функционирования и результаты, полученные с использованием каждого из этих подходов, суммированы в ряде отечественных и в сотнях зарубежных обзоров, и лишь малое их число может быть упомянуто в данной статье [41–44]. Как опто-, так и хемогенетика позволяют селективно изменять активность конкретных нейронов и их ансамблей. Оба подхода базируются на экспрессии в желаемом типе клеток, в том числе и нервных, новых для организма белков-рецепторов, воспринимающих в первом случае свет определенной длины волны, а во втором — необычную для организма химическую молекулу лиганда, связывающуюся с этим рецептором. При поступлении к клетке сигнала, воспринимаемого ее новым рецептором, в зависимости от молекулярных особенностей рецептора, множество типов которых уже создано, активность клетки, например, частота разрядов нейрона, повышается или, наоборот, снижается. Каждый из подходов имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать при планировании их использования. Так, при поступлении света на оптогенетический рецептор, ответ нейрона происходит практи-

чески мгновенно. В то же время для развития ответа на хомогенетический сигнал необходимо более получаса. Поэтому при анализе немедленных реакций предпочтительнее оптогенетика. Так, в опытах с оптогенетической стимуляцией глутаматергических нейронов области CA1 дорзального гиппокампа, которая обеспечивалась экспрессией в этих нейронах фоточувствительного канала ChR2H134 под специфичным для этих нейронов промотором САМКПа в составе AAV вектора, впервые установлено, что увеличение проявления депрессивно-подобного поведения крыс – продолжительности неподвижного состояния в тесте, происходило только непосредственно под влиянием оптогенетической стимуляции – в 1-минутные периоды теста, когда клетки гиппокампа освещались синим (470 нм) светом, и не наблюдалось в чередующиеся со световыми 1-минутными периодами без оптогенетической стимуляции [45]. Оптогенетический подход позволил, например, также впервые обнаружить быстрое повышение в ответ на активацию нейрона экспрессии белка Vcl-x1, сходное по времени с индукцией гена раннего ответа *c-Fos* [46].

Из двух подходов, обеспечивающих избирательное по типу клеток и анатомической локализации изменение активности нейронов, хомогенетика, особенно в варианте DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) [47], более привлекательна, чем оптогенетика, для анализа и модуляции функции нейронных сетей, участвующих в проявлении, например, психо-поведенческих свойств организма. Преимущество хомогенетики по сравнению с оптогенетикой заключается в возможности одним и тем же лигандом активировать одни и одновременно ингибировать другие участки нейронной сети в условиях свободного поведения животных [48]. Это преимущество обуславливает возможность хомогенетического подхода модифицировать в желаемом направлении активность взаимодействующих структур мозга, что поможет выяснить, как изменения коннективности мозга реализуются в психо-поведенческих проявлениях.

В целом, уже существующие, а также постоянно создаваемые новые генетически кодируемые инструменты открывают широчайшие возможности для исследований функций мозга и коррекции их нарушений как на молекулярно-клеточном уровне, так и на уровне нейронных сетей. Последнее является особенно важным в свете все более укрепляющихся представлений, что проявления когнитивных дисфункций и психопатологии [40], а также дополнительные возможности их терапии, в том числе и с использованием технологии DREADDs [49], базируются не только, а может быть и не столько на внутринейронных и/или синаптических процессах, сколько на согласованной нормальной или аберрантной активности нейронных сетей [50], участвующих в осуществлении высших функций головного мозга.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при поддержке гранта РФФИ 19-15-00093.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sprengel R., Hasan M.T. Tetracycline-controlled genetic switches. *Handb. Exp. Pharmacol.* (178): 49–72. 2007.
2. Harris J.A., Hirokawa K.E., Sorensen S.A., Gu H., Mills M., Ng L.L., Bohn P., Mortrud M., Ouellette B., Kidney J., Smith K.A., Dang C., Sunkin S., Bernard A., Oh S.W., Madisen L., Zeng H. Anatomical characterization of Cre driver mice for neural circuit mapping and manipulation. *Front. Neural Circuits.* 8: 76. 2014.
3. Schoch K.M., Miller T.M. Antisense oligonucleotides: translation from mouse models to human neurodegenerative diseases. *Neuron.* 94(6): 1056–1070. 2017.
4. Juliano R.L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 44(14): 6518–6548. 2016.
5. Dygalo N.N., Kalinina T.S., Lanshakov D.A. Translocation of oligonucleotide-oligosaccharide complexes into cells of the brain. *Dokl. Biochem. Biophys.* 479(1): 108–110. 2018.

6. *Cwetsch A.W., Pinto B., Savardi A., Cancedda L.* In vivo methods for acute modulation of gene expression in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 168: 69–85. 2018.
7. *Tabata H., Nakajima K.* Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: Visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience.* 103(4): 865–872. 2001.
8. *Palfi S., Gurruchaga J.M., Lepetit H., Howard K., Ralph G.S., Mason S., Gouello G., Domenech P., Buttery P.C., Hantraye P., Tuckwell N.J., Barker R.A., Mitrophanous K.A.* Long-term follow-up of a phase i/ii study of prosavin, a lentiviral vector gene therapy for parkinson's disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 29(3): 148–155. 2018.
9. *Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T.* Biological efficacy of antisense oligonucleotides complementary to over-lapping regions of the mRNA target. *Russ. Chem. Bull. International Edition.* 51(7): 1031–1034. 2002.
10. *Sahu N.K., Shilakari G., Nayak A., Kohli D.V.* Antisense technology: A selective tool for gene expression regulation and gene targeting. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 8(5): 291–304. 2007.
11. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Y., Dygalo N.N.* Effects of antisense to the (alpha)2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. *J. Neurosci.* 21(2): 726–731. 2001.
12. *Finkel R.S., Chiriboga C.A., Vajsar J., Day J.W., Montes J., De Vivo D.C., Yamashita M., Rigo F., Hung G., Schneider E., Norris D.A., Xia S., Bennett C.F., Bishop K.M.* Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: A phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet.* 388(10063): 3017–3026. 2016.
13. *Mercuri E., Darras B.T., Chiriboga C.A., Day J.W., Campbell C., Connolly A.M., Iannaccone S.T., Kirschner J., Kuntz N.L., Saito K., Shieh P.B., Tulinius M., Mazzone E.S., Montes J., Bishop K.M., Yang Q., Foster R., Gheuens S., Bennett C.F., Farwell W., Schneider E., De Vivo D.C., Finkel R.S.; CHERISH Study Group.* Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N. Engl. J. Med.* 378(7): 625–635. 2018.
14. *Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411(6836): 494–498. 2001.
15. *Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22(3): 326–330. 2004.
16. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N.* Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience.* 129(3): 521–528. 2004.
17. *Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T.* Neonatal programming of rat behavior by downregulation of alpha2A-adrenoreceptor gene expression in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148: 409–414. 2008.
18. *Wyszko E., Rolle K., Nowak S., Zukiel R., Nowak M., Piestrzeniewicz R., Gawrońska I., Barciszewska M.Z., Barciszewski J.* A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA. *Acta Pol. Pharm.* 65(6): 677–684. 2008.
19. *Adams D., Gonzalez-Duarte A., O'Riordan W.D., Yang C.C., Ueda M., Kristen A.V., Tourneir I., Schmidt H.H., Coelho T., Berk J.L., Lin K.P., Vita G., Attarian S., Planté-Bordeneuve V., Mezei M.M., Campistol J.M., Buades J., Brannagan T.H. 3rd, Kim B.J., Oh J., Parman Y., Sekijima Y., Hawkins P.N., Solomon S.D., Polydefkis M., Dyck P.J., Gandhi P.J., Goyal S., Chen J., Strahs A.L., Nochur S.V., Sweetser M.T., Garg P.P., Vaishnaw A.K., Gollob J.A., Suhr O.B.* Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 379(1): 11–21. 2018.
20. *Sarno E., Robison A.J.* Emerging role of viral vectors for circuit-specific gene interrogation and manipulation in rodent brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 174: 2–8. 2018.
21. *McCarty D.M., Young S.M. Jr., Samulski R.J.* Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38: 819–845. 2004.
22. *Tye K.M., Deisseroth K.* Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Rev. Neurosci.* 13: 251–266. 2012.
23. *Verheij M.M.M., Contet C., Karel P., Latour J., van der Doelen R.H.A., Geenen B., van Hulst J.A., Meyer F., Kozicz T., George O., Koob G.F., Homberg J.R.* Median and dorsal raphe serotonergic neurons control moderate versus compulsive cocaine intake. *Biol. Psychiatry.* 83:1024–1035. 2018.
24. *Gong S., Doughty M., Harbaugh C.R., Cummins A., Hatten M.E., Heintz N., Gerfen C.R.* Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* 27(37): 9817–9823. 2007.
25. *Song M.S., Rossi J.J.* Molecular mechanisms of Dicer: Endonuclease and enzymatic activity. *Biochem. J.* 474(10): 1603–1618. 2017.

26. *Toro C.G., Mueller C.* Design of shRNA and miRNA for delivery to the CNS. *Methods Mol. Biol.* 1382: 67–80. 2016.
27. *Albert K., Voutilainen M.H., Domanskyi A., Airavaara M.* AAV vector-mediated gene delivery to substantia nigra dopamine neurons: Implications for gene therapy and disease models. *Genes (Basel)*. 8(2): 63. 2017.
28. *Chtarto A., Bockstael O., Tshibangu T., Dewitte O., Levivier M., Tenenbaum L.* A next step in adeno-associated virus-mediated gene therapy for neurological diseases: Regulation and targeting. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76(2): 217–232. 2013.
29. *Das A.T., Tenenbaum L., Berkhout B.* Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr. Gene Ther.* 16(3): 156–167. 2016.
30. *Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., Kalinina T.S., Agarina N.P., Dygalo N.N.* Doxycycline used for control of transgene expression has its own effects on behaviors and Bcl-xl in the rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38(1): 281–288. 2018.
31. *Nishiyama J.* Genome editing in the mammalian brain using the CRISPR-Cas system. *Neurosci. Res.* 141: 4–12. 2019.
32. *Senis E., Fatouros C., Grosse S., Wiedtke E., Niopek D., Mueller A.K., Borner K., Grimm D.* CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol. J.* 9: 1402–1412. 2014.
33. *Swiech L., Heidenreich M., Banerjee A., Habib N., Li Y., Trombetta J., Sur M., Zhang F.* In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 33: 102–106. 2015.
34. *Sander J.D., Jong J.K.* CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32: 347–355. 2014.
35. *Straub C., Granger A.J., Saulnier J.L., Sabatini B.L.* CRISPR/Cas9-mediated gene knock-down in post-mitotic neurons. *PLoS One.* 9: e105584. 2014.
36. *Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., PR Iyer E., Lin S., Kiani S., Guzman C.D., Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B. E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G. M.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods.* 12: 326–328. 2015.
37. *Lau C.H., Ho J.W., Lo P.K., Tin C.* Targeted transgene activation in the brain tissue by systemic delivery of engineered AAV1 expressing CRISPRa. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 16: 637–649. 2019.
38. *Savell K.E., Day J.J.* Applications of CRISPR/Cas9 in the Mammalian Central Nervous System. *Yale J. Biol. Med.* 90(4):567-581. 2017.
39. *Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K.* Millisecond timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8: 1263–1268. 2005.
40. *Gremel C.M., Costa R.M.* Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nat. Commun.* 4: 2264. 2013.
41. *Fenno L., Yizhar O., Deisseroth K.* The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* 34: 389–412. 2011.
42. *Sternson S.M., Roth B.L.* Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 37: 387–407. 2014.
43. *Urban D.J., Roth B.L.* DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55: 399–417. 2015.
44. *Dygalo N.N., Shishkina G.T.* Optogenetic approach in investigations of pathophysiology and therapy of depression. *Zh. vysshei nervn. deyatelnosti im. I.P. Pavlova.* 67(5): 32–40. 2017.
45. *Dygalo N.N., Lanshakov D.A., Drozd U.S., Sukhareva E.V., Bulygina V.V., Kalinina T.S.* Optogenetic activation of the CA1 hippocampal pyramidal neurons induces a depressive-like behavioral phenotype. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26(S2): S277–S278. 2016.
46. *Lanshakov D.A., Drozd U.S., Dygalo N.N.* Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in neurons. *Biochemistry (Mosc).* 82(3): 340–344. 2017.
47. *Sternson S.M., Roth B.L.* Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 37: 387–407. 2014.
48. *Campbell E.J., Marchant N.J.* The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: Receptor variants, targeting approaches and caveats. *Br. J. Pharmacol.* 175(7): 994–1003. 2018.
49. *Yun S., Reynolds R.P., Petrof I., White A., Rivera P.D., Segev A., Gibson A.D., Suarez M., DeSalle M.J., Ito N., Mukherjee S., Richardson D.R., Kang C.E., Ahrens-Nicklas R.C., Soler I., Chetkovich D.M., Kourrich S., Coulter D.A., Eisch A.J.* Stimulation of entorhinal cortex-dentate gyrus circuitry is antidepressive. *Nat. Med.* 24(5): 658–666. 2018.
50. *Duman R.S., Sanacora G., Krystal J.H.* Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron.* 102(1): 75–90. 2019.

Investigation of the Brain Functions Using Genetically Encoded Tools**N. N. Dygalo****Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia Novosibirsk State University,
Novosibirsk, Russia***e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru*

Abstract—Methods based on genetically-encoded molecular constructs, such as antisense-knockdown and RNA interference that alter the expression of target genes, are widely used to analyze the function of proteins encoded by these genes, and also find application in medical practice. Using these methods, for example, we found that even a short-term decrease in the expression of one of the norepinephrine receptors during the critical period of brain development leaves a long-lasting impact on the neurochemical and behavioral traits in later life. Delivery into the brain cells of viral vectors encoding any proteins that affect cell function or small hairpin RNA (shRNA) that reduce the expression of the target gene, also finds use in neurobiology. A vivid manifestation of the power of genetically encoded instruments in studies of the central nervous system, instruments potentially suitable for controlling the activity of brain cells for therapeutic purposes are optogenetics and chemogenetics. Both approaches realized by expressing receptors in the desired cell type that are new to the body, reacting to light of a certain wavelength or a chemical ligand unusual for the body. These approaches make it possible to evaluate the functional consequences of changes in the activity of a specific population of neurons, which, for example, has provided significant progress in deciphering the mechanisms of central regulation of behavior. For example, using optogenetics, we found that the activation of glutamatergic neurons of the dorsal hippocampus induces a depressive-like behavior, and the antidepressant effect of ketamine on this behavior produced by its direct action on the NMDA receptors. Developed in the past few years, genome editing and gene expression management techniques based on bacterial CRISPR/Cas systems already used to study brain function. At present, possible applications of opto- and chemogenetics, as well as CRISPR/Cas technologies in medicine are being developed on model objects with optimistic expectations.

Keywords: antisense knockdown, RNA interference, optogenetics, chemogenetics, genome editing, control of gene expression

ЦИТИРОВАТЬ:

Дыгало Н.Н. Исследование функций мозга генетически кодируемыми инструментами. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(11): 1381–1391.

DOI: 10.1134/S0869813919110049

TO CITE THIS ARTICLE:

Dygalo N.N. Investigation of the Brain Functions Using Genetically Encoded Tools. *Russian Journal of Physiology.* 105(11): 1381–1391.

DOI: 10.1134/S0869813919110049