

Технология редактирования генома и возможности ее применения в клеточной нейробиологии

А.С. Ветчинова, Е.В. Коновалова, Е.А. Лунев, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва);

Балтийский федеральный университет им. И. Канта (Калининград)

В настоящее время благодаря серии фундаментальных открытий в клеточной и молекулярной биологии появилось несколько высокотехнологичных подходов к моделированию неврологических (в первую очередь нейродегенеративных) заболеваний человека. Среди них – направленное геномное редактирование с помощью искусственных нуклеазных систем (CRISPR/CAS9 и др.), позволяющее осуществлять высокоспецифичное исправление генетических дефектов на уровне клеток. Особенно перспективным представляется применение технологии геномного редактирования на специализированных нейронах и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), получаемых из фибробластов больных с наследственными формами нейродегенерации в результате клеточного репрограммирования. В статье проводится краткий анализ систем программируемых нуклеаз, рассматриваются механизмы их работы, преимущества, недостатки и возможности применения в моделировании и коррекции нейродегенеративных заболеваний. Обобщен собственный опыт в клеточном моделировании PARK2-формы болезни Паркинсона на культуре дофаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК. Представлены предварительные данные, связанные с возможностью редактирования генома клеток в мутантных сайтах PARK2.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, редактирование генома, CRISPR/CAS9, экспериментальная нейробиология.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой острейшую проблему современной медицины, что обусловлено неуклонным постарением населения развитых стран мира и повышением удельного веса возраст-зависимых патологий в структуре неврологической заболеваемости [14, 38]. Однако разработка действенных мер борьбы с этими тяжелыми, неуклонно прогрессирующими заболеваниями препятствуют недостаточность знаний о молекулярных и клеточных механизмах нейродегенеративного процесса и нехватка адекватных модельных систем.

К числу наиболее изучаемых в настоящее время нейродегенеративных заболеваний относятся болезнь Паркинсона (БП), болезнь Гентингтона (БГ) и боковой амиотрофический склероз (БАС). С этиологической точки зрения заболевания БП и БАС являются чрезвычайно гетерогенными и обусловлены сложным взаимодействием между совокупностью генетических и средовых факторов риска. Активное изучение молекулярных основ развития моногенных форм БП и БАС позволило идентифицировать множество генов, вовлеченных в их патогенез [4, 5, 10, 24, 31, 33]. При БГ мутация во всех случаях заключается в экспансии тандемных полиглутамин-кодирующих (CAG)_n-повторов в гене *HTT* [6]. Однако выявление мутации – это лишь самый первый шаг на длинном пути, конечной целью которого является адекватное и эффективное лечение болезни. Все мутации действуют по-разному, и механизмы реализации действия мутантного гена весьма многообразны – от утраты функции соответствующего белка (при точковых нонсенс-мутациях и инактивирующих миссенс-мутациях) до приобретения мутантным белком новых цитотоксических свойств (удлинение полиглутаминовых

треков при БГ, спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди и других полиглутаминовых заболеваниях). Именно это и обуславливает исключительную сложность поиска ключевых звеньев патогенеза и создания соответствующих препаратов-нейропротекторов адресного, направленного действия. Тем не менее, несмотря на значительные клинико-морфологические и генетические различия, все эти заболевания имеют ряд сходных характеристик: длительный латентный период, позднее начало, нарушение механизмов белкового процессинга, формирование агрегатов и белковых включений, трансинаптическая передача патологической конформации белка и т.д. [3, 21, 25]. Это позволяет предположить, что на определенном этапе гибель специфических популяций нейронов может опосредоваться общими молекулярными механизмами и метаболическими путями.

Сегодня в распоряжении исследователей есть несколько высокотехнологичных подходов к моделированию нейродегенерации, ставших результатом фундаментальных открытий в клеточной и молекулярной биологии последнего десятилетия. Это знаменует собой новую эру в экспериментальных нейронауках.

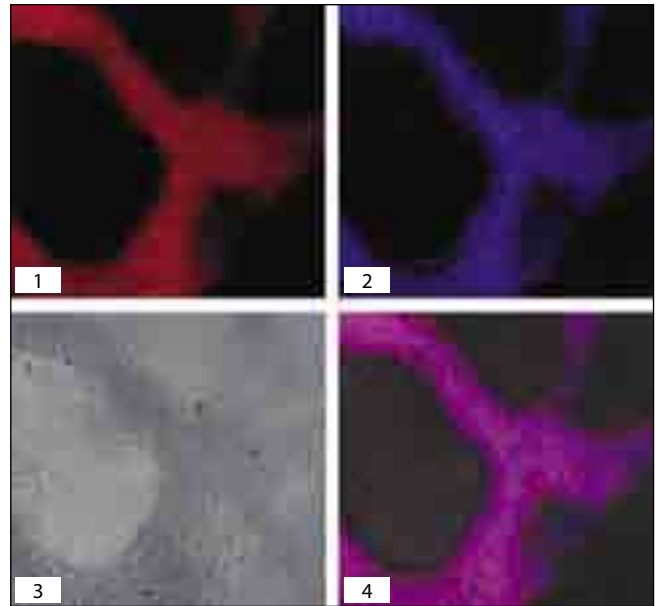
Моделирование нейродегенеративных процессов с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные из зрелых соматических клеток, представляют собой уникальную платформу для изучения генов, вовлеченных в молекулярные механизмы возникновения разнообразных патологий, моделирования заболева-

ний и изучения действия лекарственных препаратов [35]. ИПСК способны генерировать все клеточные типы, включая редкие и труднодоступные популяции клеток человека. В типичных случаях источником ИПСК служат кожные фибробласты, которые конвертируются в клеточные плюрипотентные элементы в результате активации в них четырех генов (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*), наиболее активных на этапе раннего эмбрионального развития [1]. Таким образом, сегодня существует принципиальная возможность перепрограммировать соматические клетки, меняя их специализацию и «стирая» клеточную память, связанную с индивидуальным развитием.

Благодаря способности ИПСК дифференцироваться *in vitro* в зрелые специализированные нейроны такие клетки могут рассматриваться в качестве «идеального» источника клеток для нейротрансплантации у донора фибробластов, страдающего БП или другим нейродегенеративным заболеванием, имея в виду генетическую идентичность трансплантируемых нейронов любым клеткам данного пациента. Однако, кроме вопроса о заместительной клеточной терапии, существует проблема «персонализированных» клеточных моделей: поскольку доступ к живым нейронам человека практически невозможен, а исследование новых лекарственных препаратов *in vivo* проблематично из-за различий метаболизма ксенобиотиков в организмах человека и животного, единственным выходом представляется именно культуры ИПСК, дифференцированные в соответствующие специализированные типы нейронов [9, 22, 23].

Хорошей иллюстрацией сказанному могут служить результаты наших исследований, показавших значительный потенциал ИПСК в изучении тонких механизмов развития генетических *PARK2*- и *LRRK2*-ассоциированных форм БП. Так, установлено, что линии ИПСК от пациентов с различными мутациями и от здоровых лиц при одинаковых условиях культивирования имеют разное соотношение нейрональных предшественников и дифференцированных нейронов: если контрольная линия содержала 56% клеток-предшественников, то линия, несущая мутацию *LRRK2*-G2019S, – 35% предшественников, а культура с компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *PARK2* (*del202-203AG* и *IVS1+1G/A*) – лишь 4% нейрональных предшественников [8]. При оценке про- и антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 в дофаминергических нейронах, дифференцированных из ИПСК здорового донора и больного БП с мутациями в гене *PARK2*, методом Вестерн-блоттинга показано, что уровень проапоптотического белка Bax в клетках с мутацией *PARK2* практически вдвое ниже по сравнению со здоровыми клетками; напротив, экспрессия антиапоптотических факторов Bcl-XL, Bcl-W и Bcl-2 достоверно повышена в мутантных клетках по сравнению со здоровыми дофаминергическими нейронами. Полученные результаты позволяют предположить, что мутации *PARK2* сопровождаются сложной разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели, в рамках которой ведущая роль принадлежит неапоптозным молекулярным механизмам [7]. Интересно, что в клетках с мутациями *PARK2* уровень экспрессии транспортера дофамина DAT был достоверно выше по сравнению с нормальными нейронами, однако при этом «мутантные» нейроны характеризовались функциональной недостаточностью систем дофамина транспорта (рис. 1). Эти данные помогают уточнить состояние дофаминергических систем специализированных нейронов при генетических вариантах БП, что является необходимым условием для создания новых противопаркинсонических лекарственных средств.



A



Б

рис. 1: Клеточная модель *PARK2*-ассоциированной формы БП на основе ИПСК (конфокальная микроскопия).

A – дофаминергические нейроны, полученные из ИПСК пациента с мутациями в гене *PARK2*: окраска флуоресцентным аналогом дофамина ASP+ (1), окраска ядерным маркером DAPI (2), фотография клеток в проходящем свете (3), наложение красителей на фотографию клеток в проходящем свете (4). Общее количество клеток, окрашенных ASP+, составляет около 80% (эффективность методики получения дофаминергических нейронов, содержащих моноаминоергический транспортер).

Б, В – исследование активности работы дофамина транспортера DAT в нормальной культуре дофаминергических нейронов (Б) и в культуре дофаминергических нейронов, полученных из ИПСК пациента с мутациями в гене *PARK2* (В). Накопление ASP+ (верхний ряд) приводит к флуоресценции в здоровых клетках, достоверно превышающей уровень флуоресценции в клетках носителя мутаций *PARK2*. При конкурентном добавлении дофамина (средний ряд) в здоровых клетках сигнал от ASP+ подавляется в большей степени, чем в мутантной культуре; это свидетельствует о более активном накоплении дофамина здоровыми клетками по сравнению с мутантными. Таким образом, оба теста показывают функциональную недостаточность транспортера дофамина DAT в дофаминергических нейронах, несущих мутации *PARK2*.

Технологии направленного редактирования генома

Несомненным «прорывом» в молекулярной биологии, произошедшим в 2006–2014 гг., стало появление методов исправления генетических дефектов на уровне клеток (в т.ч. ИПСК) с помощью технологий *редактирования генома*, т.е. встраивания в клеточный клон нормальной копии гена посредством специальных методов генной инженерии [11, 19, 28].

Технологии направленного редактирования генома на основе программируемых нуклеаз предоставляет возможность эффективной и прицельной генетической модификации интересующих сайтов-мишеней высокоспецифическими нуклеазами. Для редактирования генома применяют искусственные нуклеазные системы «цинк-пальцевых» доменов, TALEN и CRISPR/Cas. Индуцируемые нуклеазами двухнитевые разрывы могут быть подвергнуты репарации по одному из двух возможных механизмов. Негомологичное воссоединение концов способствует эффективному внесению мутаций типа инсерций или делеций различной длины, которые могут приводить к смещению рамки считывания и быть причиной нарушения связывания транскрипционных факторов с промоторами генов. Гомологическая репарация может быть использована для внесения направленных точечных мутаций или введения желаемой последовательности через рекомбинацию локуса мишени с привнесенной донорной эндогенной ДНК-матрицей. В качестве донора используют вектор или просто одноцепочечную ДНК.

Редактирование генома с помощью искусственной нуклеазной системы, содержащей домены типа «цинковых пальцев»

Первым инструментом для коррекции генома стала эндонуклеаза, содержащая в своем составе последовательности типа «цинковых пальцев» (ZNF); она представляет собой белковый комплекс, состоящий из разрезающего ДНК фермента Fok I и ДНК-связывающего домена [11, 36]. Для связывания субъединицы ZNF с ДНК длиной 9–18 пар оснований (п.о.) необходимо от 3 до 6 доменов «цинковых пальцев». 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 [27, 30]. Такой подход может быть применен для коррекции генов или добавления новых генов в интересующем локусе [36]. Применение ZNF-систем редактирования генома на ИПСК позволяет создавать уникальные исследовательские платформы для решения большого числа фундаментальных вопросов нейробиологии [2]. Использование данного подхода позволило внести мутации A53T (G209A) и E46K (G188A) в ген *SNCA* эмбриональных культур человеческих клеток для воссоздания модели БП (ген *SNCA* кодирует альфа-синуклеин – основной компонент телец Леви). Одновременно в этой работе была проведена успешная коррекция мутации A53T с помощью ZNF и двухцепочечного донорного вектора в ИПСК, полученных из фибробластов пациента с БП [34]. Двухстадийная ZNF-коррекция мутации A4V гене *SOD1* в культуре ИПСК с последующей дифференцировкой в мотонейроны позволила провести сравнительный анализ экспрессии белка SOD1 и морфологию мотонейронов «вылеченных» культур по сравнению с мотонейронами, полученными из фибробластов пациентов с БАС [26].

Система ZNF позволяет также регулировать экспрессию генов путем создания химерных конструкций, содержащих ДНК-связывающий домен и синтетический домен VP64 (158–2) или KRAB (161–2). Так, химерный белок ZNF-KRAB использовался для подавления экспрессии «хореического» гена *HTT* в мозге мышей линии R6/2, служащих моделью БГ. Доставка с помощью аденовирусных векторов химерного белка приводила к значительному снижению уровня экспрессии мутантной РНК и белка гентингина [20]. Таким образом, технология с применением ZNF стала первым программируемым инструментом для коррекции генома, однако она подразумевает использование белков, которые сложно модифицировать для применения с новыми генами-мишенями. Поскольку отсутствует коллекция из 64 «цинковых пальцев», покрывающая все возможные комбинации нуклеотидных триплетов, применение ZNF ограничено. Кроме того, при использовании данной технологии возможно также появление потенциально опасных непреднамеренных разрезов ДНК.

Редактирование генома с помощью TALEN-системы

В последние годы накопленные данные в фундаментальных исследованиях генома прокариот привели к созданию новых инструментов редактирования – систем TALEN (*Transcription Activator Like Effector Nucleases*) и CRISPR/CAS9 (см. далее). Эти системы отличаются относительной простотой конструирования и высокой эффективностью работы в клетках человека, животных и растений [16, 19, 32]. В системе TALEN роль ДНК-распознающих структур играют белковые домены, каждый из которых «узнает» только один нуклеотид. Четыре тандемных повтора Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp и Asn-Gly достаточны для узнавания гуанина, аденина, цитозина и тимина и, следовательно, для создания TALEN с уникальными свойствами. Поскольку механизм «узнавания» ДНК в данном случае однозначен и прост, получение конструкции, специфично распознающей нужную исследователю нуклеотидную последовательность, – относительно простая задача. Соединяя такую направляющую конструкцию с ферментом, расщепляющим ДНК (как правило, для этих целей используется Fok I – каталитический домен фермента рестрикции), можно получить систему с высокой специфичностью действия.

В терапевтических целях TALEN-систему возможно применить и для регуляции экспрессии генов, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями. Для проверки этого подхода химерный белок TALEN-VP64 применяли для повышения уровня экспрессии гена *FXN*, кодирующего железотранспортирующий белок фратаксин – «виновник» развития атаксии Фридрейха. Показано, что с помощью TALEN-VP64 можно повысить экспрессию гена *FXN* в фибробластах человека, несмотря на увеличенное число тринуклеотидных повторов GAA в мутантных клетках [15].

Несмотря на относительную легкость и дешевизну синтеза по сравнению с комплексами «цинковых пальцев», белки TALEN достаточно сложно доставлять внутрь клеток. Проблемой также является возможность непреднамеренных разрезов ДНК.

Бактериальная система CRISPR/Cas как основа для создания новых инструментов редактирования генома

В 2012–2013 гг. был разработан «революционный» метод генетической инженерии CRISPR/Cas, открывший принципиально новые возможности для манипуляций на уровне генома высших организмов [17]. Этот метод чрезвычайно

прост, обеспечивает точное воздействие на заданные участки ДНК и может быть использован практически в любой современной молекулярно-биологической лаборатории. В отличие от химерных нуклеаз в CRISPR/Cas структурами, узнающими ДНК, являются не белки, а короткие РНК. Идея создания такой системы родилась при изучении механизмов, которые бактерии используют для защиты от своих патогенных вирусов (бактериофагов). Конкретно речь идет о своеобразной «иммунной» реакции бактерий на проникновение определенного бактериофага, которая выражается в избирательном расщеплении его геномной ДНК. Работа всего механизма обеспечивается специальными участками бактериального генома – CRISPR-локусами (от англ.: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Как видно по названию, локусы состоят из стандартных повторных некодирующих последовательностей бактериальной ДНК, а разделяют эти повторы спейсеры – короткие фрагменты чужеродной (вирусной или плазмидной) ДНК. Состав и порядок расположения спейсеров указывает на число «атак» различных вирусов, успешно пережитых самой бактериальной клеткой и/или ее родительскими поколениями [12, 29]. Благодаря своей высокой специфичности и способности к быстрой «настройке» система CRISPR/Cas работает очень эффективно, обеспечивая хозяйской клетке надежную защиту от патогенов [37].

К настоящему времени детально описаны несколько типов защитных систем CRISPR, функционирующих в клетках различных бактерий. Наиболее популярной оказалась система CRISPR/Cas типа II-A, обнаруженная у бактерии *Streptococcus pyogenes*, которая состоит из трех генов, кодирующих crRNA, транскрибирующую РНК (tracrRNA) и белок Cas9 [13]. На основе этой системы и были созданы универсальные генетические конструкции, кодирующие элементы искусственного «редактора генома» CRISPR/Cas [18]. Удобство использования стрептококковой системы CRISPR/Cas9 в эукариотических организмах заключается в том, что для нее нужны всего два компонента: РНК-гид (guideRNA, gRNA), комплементарная целевому гену, и фермент Cas9, который расщепляет этот ген. Гены этих двух компонентов помещаются в плазмиду и доставляются в клетку, где должны экспрессироваться. Более того, методика позволяет доставить в клетку сразу несколько РНК-гидов, комплементарных разным генам-мишеням, и фермент Cas9 разрежет их все.

Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR/Cas за короткое время уже нашла применение в самых различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и медицины. Уникальная способность комплекса системы CRISPR/Cas избирательно связываться с определенными участками ДНК позволила разработать на ее основе регуляторы активности генов. Для этого в систему включают каталитически неактивный мутантный белок Cas9, к которому могут быть присоединены белки, активирующие или подавляющие функции промоторов, управляющих работой генов. При связывании такого комплекса с целевой ДНК может подавляться либо стимулироваться работа целевого гена [2].

Внося направленные модификации в геном стволовых клеток человека, можно получить линии клеток-моделей наследственных заболеваний, вызванных нарушениями функций определенных генов. Такие клеточные линии являются, по сути, неограниченным источником «пациентов

в пробирке», на которых можно проводить тестирование десятков тысяч различных химических соединений – потенциальных лекарств.

Технологически стратегия геномной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas включает в себя следующие этапы: выбор целевой последовательности и определение вида необходимого воздействия; создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень; доставка ее в клеточное ядро; анализ участка генома, подвергнутого воздействию. С помощью системы CRISPR/Cas можно осуществлять все виды 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.

В нашей работе, проводимой на базе лаборатории геномной инженерии МФТИ (заведующий – к.б.н. П.Ю. Волчков), мы подобрали РНК-гиды для внесения на культуре стволовых клеток мутаций del202-203AG и IVS1+1G/A в ген *PARK2*, ассоциированный с аутосомно-рецессивным ювенильным паркинсонизмом [4, 31], а также для коррекции этих мутаций в ИПКС, полученных из фибробластов пациента с *PARK2*-формой паркинсонизма. Важнейшим моментом при работе с системой CRISPR/Cas является тщательный подбор сайтов для специфического внесения двухнитевого разрыва. Для большей специфичности CRISPR/Cas системы использовали следующие биоинформационные ресурсы и программы:

www.genome-engineering.org,
www.dna20.com/ecommerce/cas9/input
 и www.e-crisp.org.

Подобранные с помощью программы РНК-гиды имеют целью клонирование в вектор gRNA с помощью разрезания продуктов амплификации по специфическим сайтам (праймеры, использованные нами в настоящей работе, доступны по запросу). Схема плазмиды pgRNA указана на рис. 2. Полученные варианты векторных конструкций РНК-гидов тестируются на эффективность внесения двухцепочечных разрывов ДНК на клеточной линии HeLa. Для этого в клетки совместно трансфецируются различные варианты плазмид pgRNA и плазмиды pCas, содержащая ген нуклеазы Cas9 и зеленый флуоресцентный белок GFP (рис. 3). Белок GFP, находящийся в одной рамке считывания с ну-

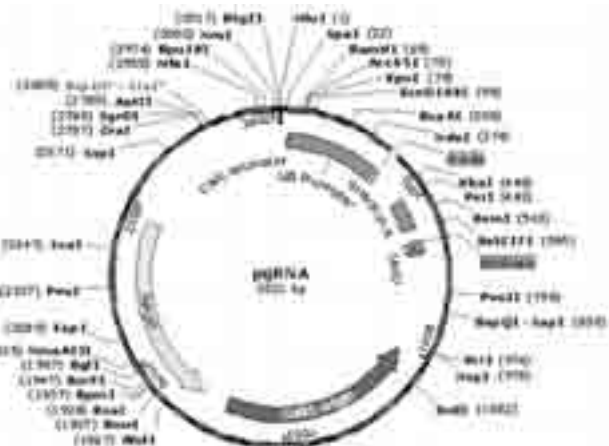


рис. 2: Схема вектора-основы pgRNA для клонирования двухцепочечных ДНК-спейсеров.

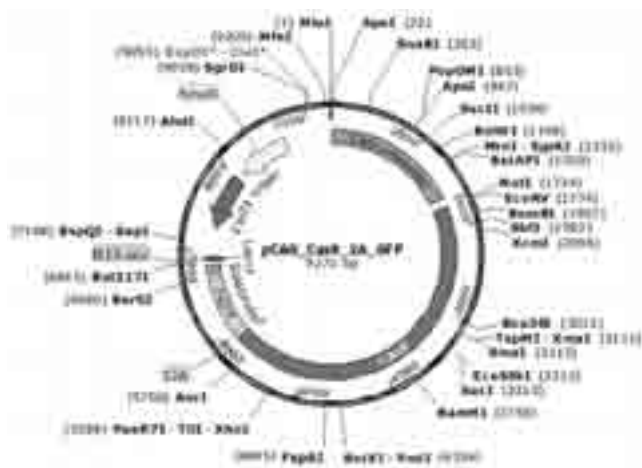


рис. 3: Схема плазмиды pCas9, используемой в экспериментах по редактированию гена *PARK2*: плазида содержит ген нуклеазы Cas9 и зеленый флуоресцентный белок GFP, соединенные через линкерную последовательность T2A.

клеазой, позволяет оценить трансфекцию путем подсчета GFP-позитивных клеток методом проточной цитометрии. Плазмиды pgRNA и pCas наработаны нами в препаративных количествах в клетках *E. coli*: их концентрации, оцененные на приборе NanoDrop 2000, составили 4 мкг/мкл и 2 мкг/мкл соответственно (рис. 4).

Таким образом, нами осуществлены необходимые предварительные этапы для реализации на практике геномного редактирования в целевых сайтах *PARK2*. Для доставки генетических конструкций в клетки будет использован метод липофильной трансфекции с Lipofectamine® 3000 (Invitrogen). Эффективность синтеза нуклеазы Cas9 оцени-

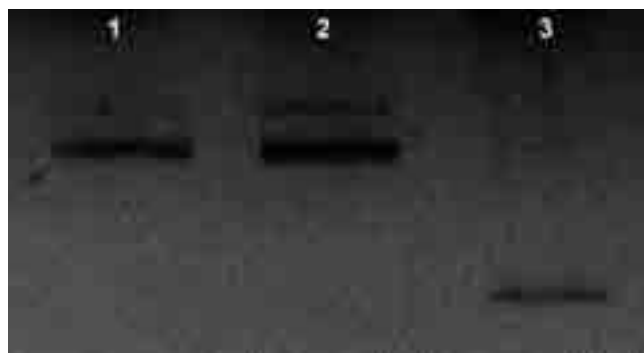


рис. 4: Электрофореграмма выделенных из культур *E. coli* плазмид pCas9 (дорожки 1 и 2) и pgRNA (дорожка 3).

вается посредством конфокальной микроскопии по экспрессии GFP, кодируемого генетической конструкцией в одной рамке считывания с геном нуклеазы Cas9 через линкерную последовательность T2A, а эффективность трансфекции – с помощью проточной цитометрии. Далее с помощью ПЦР амплифицируется целевой locus, а продукты ПЦР клонируются в pGEM-вектор. Из-за инсерций или делеций происходит нарушение/восстановление рамки считывания маркерного гена *LacZ*, и в результате подсчета синих и белых колоний после трансформации *E. coli* определяется эффективность работы системы CRISPR/Cas9.

Отработка технологий клеточного репрограммирования и геномного редактирования в моделях нейродегенеративных заболеваний *in vitro* закладывает основу для их геномной терапии в эксперименте и клинике.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-01047.

Список литературы

1. Богомазова А.Н., Васина Е.М., Киселев С.Л. и др. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования. *Генетика*. 2015; 4: 466–478.
2. Васильева Е.А., Мелино Д., Барлев Н.А. Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas к плюрипотентным стволовым клеткам. *Цитология*. 2015; 1: 19–30.
3. Завалишин И.А., Яхно Н.Н., Гаврилова С.И. (ред.) *Нейродегенеративные болезни и старение*. М.: А.А.А., 2001.
4. Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А. и др. Клинико-генетический анализ ювенильного паркинсонизма в России. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2004; 8: 66–72.
5. Иллариошкин С.Н., Загоровская И.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Генетические аспекты болезни Паркинсона. *Неврол. журн.* 2002; 5: 47–51.
6. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Новый механизм мутации у человека: экспансия тринуклеотидных повторов. *Генетика*. 1995; 31: 1478–1489.
7. Коновалова Е.В., Лопачева О.М., Гривенников И.А. и др. Экспрессия про- и антиапоптотических факторов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках здорового донора и пациента с болезнью Паркинсона, являющегося носителем мутаций в гене *PARK2*. *Acta Naturae*. 2015; 7 (4).
8. Коновалова Е.В., Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Иллариош-

- кин С.Н. Фенотипические различия культур нейронов, получаемых путем репрограммирования фибробластов пациентов с мутациями в генах паркинсонизма *LRRK2* и *PARK2*. *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2015; 6: 749–753.
9. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. и др. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. *Анн. клин. и эксперим. неврол.* 2011; 4: 37–45.
10. Лысогорская Е.В., Абрамычева Н.Ю., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Частота мутаций в гене SOD1 у российских пациентов с боковым амиотрофическим склерозом. *Мед. генетика* 2013; 4: 32–37.
11. Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Новосибирск: Изд. Сибирского отделения РАН, 2014.
12. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования генома TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий. *Acta Naturae*. 2014; 23: 20–42.
13. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315: 1709–1712.
14. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi M.H. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2007; 3: 186–191.
15. Chapdelaine P., Coulombe Z., Chikh A. et al. A potential new therapeutic approach for Friedreich ataxia: induction of frataxin expression

with TALE proteins. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2013; 2 (9): e119.

16. *Chen K., Gao C.J.* TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *Genet. Genomics*. 2013; 40: 271–279.

17. *Cong L., Ran F.A., Cox D. et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339 (6121): 819–823.

18. *Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K. et al.* Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucl. Acids Res.* 2014; 42: 2577–2590.

19. *Gaj T., Gersbach C., Barbas C.* ZNF, TALEN and CRISPR/CAS-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31: 397–405.

20. *Garriga-Canut M., Agustin-Pavon C., Herrmann F. et al.* Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *PNAS* 2012; 109: 3136–3145.

21. *Guo J.L., Lee V.M.Y.* Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* 2014; 20: 130–138.

22. *Hargus G, Ehrlich M., Hallmann A.-L., Kuhlmann T.* Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 151–173.

23. *Hunsberger J.G., Efthymiou A.G., Malik N., Behl M.* Induced pluripotent stem cell models to enable in vitro models for screening in the CNS. *Stem Cells Devel.* 2015; 24: 1852–1864.

24. *Ingre C., Roos P.M., Piehl F. et al.* Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol.* 2015; 7: 181–193.

25. *Jenner P., Morris H.R., Robbins T.W. et al.* Parkinson's disease – the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J. Parkinsons Dis.* 2013; 3: 1–11.

26. *Kiskinis E., Sandoe J., Williams L. et al.* Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 781–795.

27. *Lieber M.R.* The mechanism of double-strand DNA break repair by

the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79: 181–211.

28. *Mali P., Yang L., Esvelt K.M. et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2012; 339: 823–826.

29. *Mojica F.J., Diez-Villaseñor C., Garcia-Martínez J., Soria E.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005; 60: 174–182.

30. *Moynahan M.E., Jasin M.* Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11: 196–207.

31. *Periquet M., Lücking C.B., Vaughan J.R. et al.* Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 617–626.

32. *Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V. et al.* A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 76–81.

33. *Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V.* The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov. Disord.* 2013; 28: 14–23.

34. *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.

35. *Takahashi K, Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663–676.

36. *Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C. et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11: 636–646.

37. *Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A.* RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 2012; 482: 331–338.

38. *Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 2011; 26 (Suppl. 1): S1–58.

A genome editing technology and capabilities of its application in cellular neurobiology

A.S. Vetchinova, E.V. Konovalova, E.A. Lunev, S.N. Illarioshkin

*Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

Keywords: pluripotent stem cells, genome editing, CRISPR/CAS9, experimental neurobiology.

A number of fundamental breakthroughs in cellular and molecular biology provided the basis for several modern sophisticated approaches to modeling of human neurological (primarily neurodegenerative) diseases. In particular, targeted genome editing by artificial nuclease systems (CRISPR/CAS9, etc.) enables a highly specific correction of genetic defects at the cellular level. An especially promising area is application of the genome editing technology in specialized neurons and induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from fibroblasts of patients with inherited forms of neurodegeneration by cell reprogramming. The article

provides a brief analysis of programmable nuclease systems and describes mechanisms of their activity as well as advantages, disadvantages, and capabilities of their applications in modeling and correction of neurodegenerative diseases. The authors generalize their own experience in cellular modeling of the *PARK2* type of Parkinson's disease on the culture of dopaminergic neurons differentiated from iPSCs. The article provides preliminary data related to the capability of editing the cellular genome at mutant sites *PARK2*.

Контактный адрес: Иллариошкин Сергей Николаевич – докт. мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе, рук. отдела исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии». Москва 125367, Волоколамское ш., д. 80. Тел.: (495) 490-2043 (раб.), факс: (495) 490-2002; e-mail: snillario@gmail.com;

Ветчинова А.С. – науч. сотр. ДНК-лаборатории V неврол. отд. ФГБНУ НЦН;

Коновалова Е.В. – науч. сотр. лаб. эксперим. нейрцитологии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

Лунев Е.А. – науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических технологий Химико-биологического института БФУ им. И. Канта.