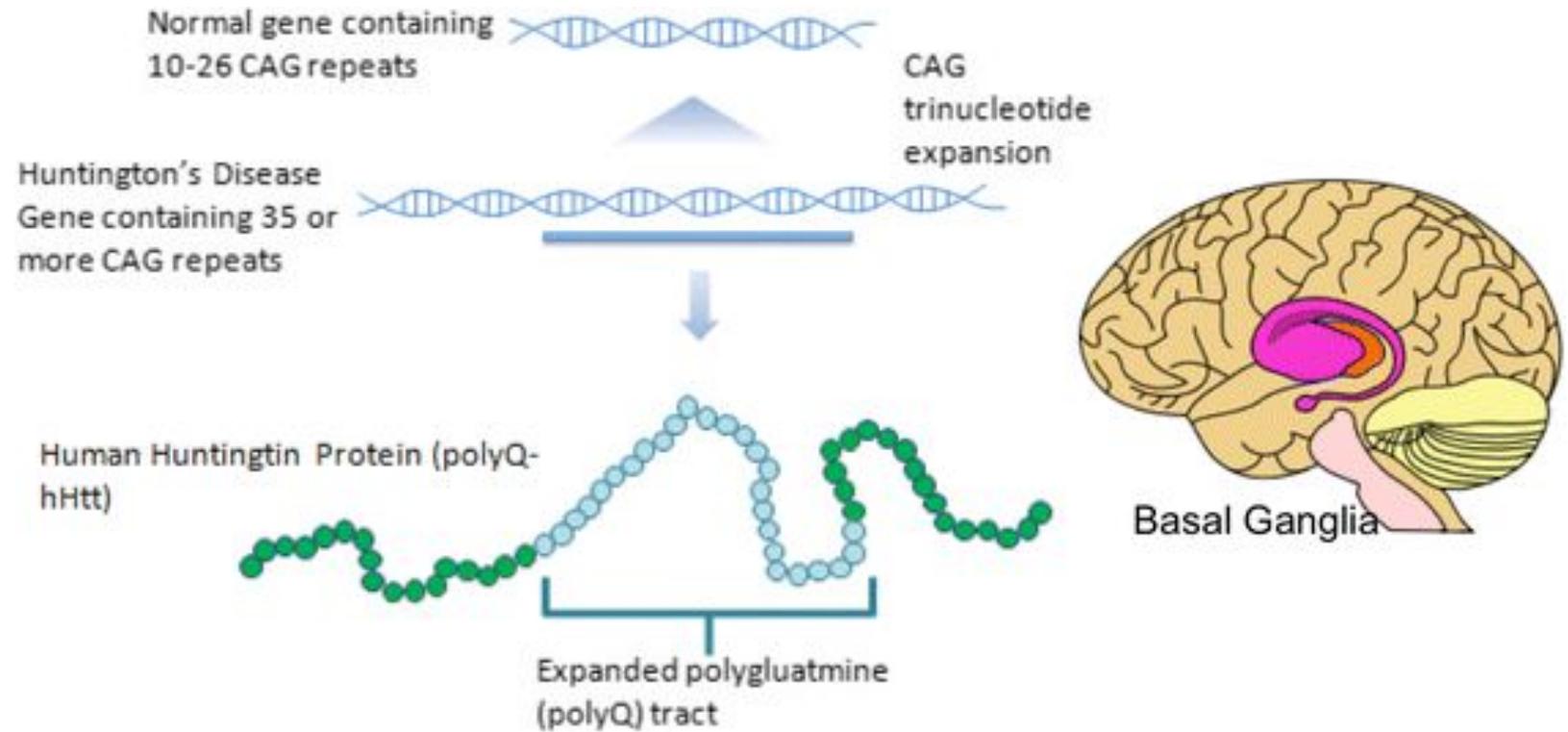


Болезнь Гантингтона

- **Нейродегенеративное** заболевание вызывается умножением кодона CAG в гене HTT
- Если их становится больше 36, то синтезируется удлинённый полиглутаминовый тракт и происходит образование мутантного белка гантингтина (mHtt), который оказывает токсичное действие на клетки и вызывает болезнь Гантингтона



Neuron. 2019 Mar 6;101(5):801-819. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.039.

Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease.

Tabrizi SJ¹, Ghosh R², Leavitt BR³.

Author information

- 1 Huntington's Disease Centre, Department of Neurodegenerative Disease, UCL Queen Square Institute of Neurology, University College London, London, UK; UK Dementia Research Institute (DRI) at UCL, London, UK. Electronic address: s.tabrizi@ucl.ac.uk.
- 2 Huntington's Disease Centre, Department of Neurodegenerative Disease, UCL Queen Square Institute of Neurology, University College London, London, UK.
- 3 UBC Centre for Huntington's Disease, Department of Medical Genetics and Centre for Molecular Medicine and Therapeutics, BC Children's Hospital, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada.

Erratum in

Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease. [Neuron. 2019]

Abstract

Huntington's disease is caused by an abnormally expanded CAG repeat expansion in the HTT gene, which confers a predominant toxic gain of function in the mutant huntingtin (mHTT) protein. There are currently no disease-modifying therapies available, but approaches that target proximally in disease pathogenesis hold great promise. These include DNA-targeting techniques such as zinc-finger proteins, transcription activator-like effector nucleases, and CRISPR/Cas9; post-transcriptional huntingtin-lowering approaches such as RNAi, antisense oligonucleotides, and small-molecule splicing modulators; and novel methods to clear the mHTT protein, such as proteolysis-targeting chimeras. Improvements in the delivery and distribution of such agents as well as the development of objective biomarkers of disease and of HTT lowering pharmacodynamic outcomes have brought these potential therapies to the forefront of Huntington's disease research, with clinical trials in patients already underway.

Copyright © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9; HD biomarkers; Huntington's disease; RNAi; antisense oligonucleotides; drug delivery; genome editing; proteolysis-targeting chimeras; small-molecule splicing modulators; transcription activator-like effector nucleases; zinc-finger proteins

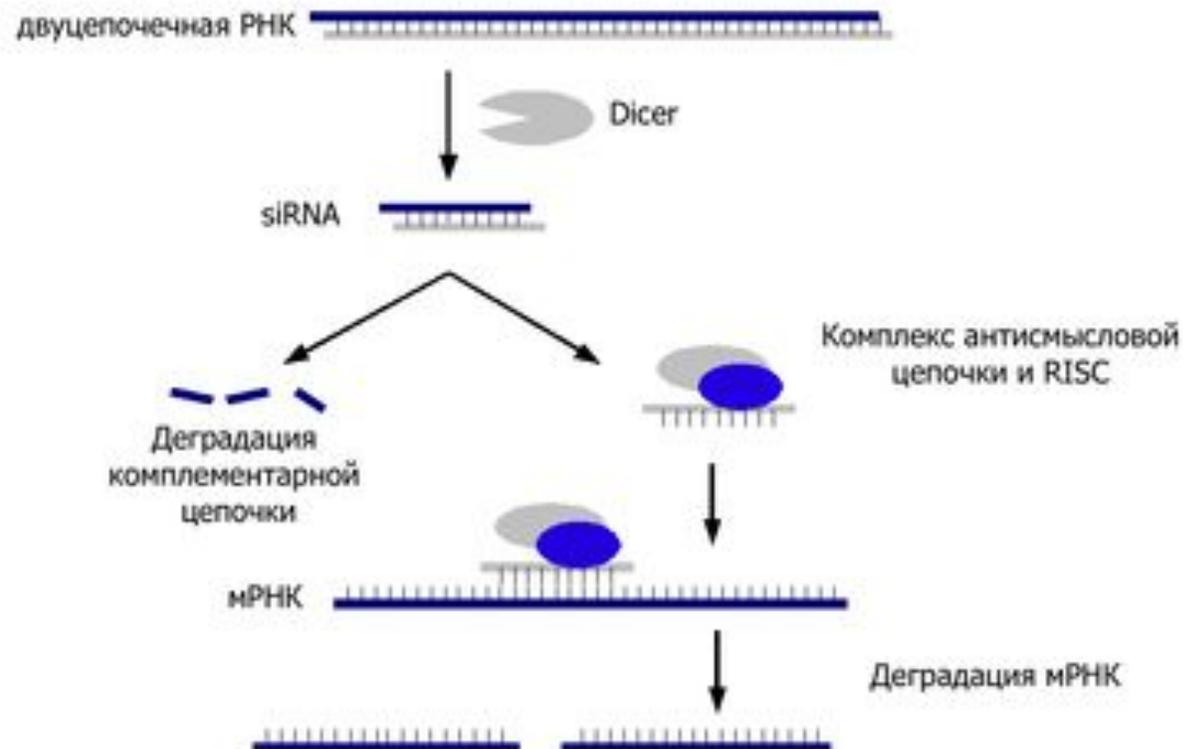
PMID: 30844400 DOI: [10.1016/j.neuron.2019.01.039](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.039)

[Indexed for MEDLINE]

Методы лечения БГ

1. Антисмысловые РНК
2. Редактирование ДНК
 - Мегануклеазы на основе цинковых пальцев
 - CRISPR / Cas9 мегануклеазы
3. Применение ИПСК без редактирования мутации
4. Ингибирование пролилוליгопептидазы.
(снижает агрегацию PolyQ и улучшает жизнеспособность клеток в клеточной модели болезни Хантингтона)

Антисмысловые РНК



ИПСК без редактирования

- 1) Биопсия соматических клеток (фибробластов)
- 2) Получение ИПСК
- 3) дифференцировка клеток в нужном направлении
- 4) прямая инъекция клеток в Полосатое тело

Плюс:

+ Не надо редактировать геном (немного ниже риск образования опухоли)

Минус:

- Повторные инъекции при появлении симптомов

Редактирование ДНК

Вирусный вектор напрямую в организм *in vivo*

Использование мегануклеаз на основе цинковых пальцев, т.к. они специфично режут ДНК, но их сложнее создать

- 1) Создание вируса
- 2) Прямая инъекция вируса в Полосатое тело

Нокаунт Гена  Нет белка

С помощью ИПСК

Использование мегануклеаз на основе CRISPR / Cas9 они НЕспецифично режут ДНК, создать ЛЕГЧЕ.

- 1) Биопсия соматических клеток (фибробласты)
- 2) Репрограммирование в ИПСК
- 3) Редактирование мутации
- 4) Отбор клеток
- 5) Дифференцировка клеток в нужном направлении
- 6) Прямая инъекция в Полосатое тело

Гомологичная Рекомбинация  Исправление мутации

Использование ИПСК в качестве лечения БГ



CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease

[Su Yang](#),¹ [Renbao Chang](#),^{1,2,3} [Huiming Yang](#),¹ [Ting Zhao](#),¹ [Yan Hong](#),¹ [Ha Eun Kong](#),¹ [Xiaobo Sun](#),⁴ [Zhaohui Qin](#),⁵ [Peng Jin](#),¹ [Shihua Li](#),¹ and [Xiao-Jiang Li](#)^{1,6}

Published online 2017 Jan 4.

PMID: [28129107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28129107/)

doi: [10.1016/j.ymthe.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.010)

CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo

[Alex Mas Monteys](#),^{1,*} [Shauna A. Ebanks](#),¹ [Megan S. Keiser](#),¹ and [Beverly L. Davidson](#)^{1,2,**}

Published online 2016 Sep 15. doi: [10.1093/hmg/ddw286](https://doi.org/10.1093/hmg/ddw286)

PMID: [28172889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28172889/)

Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9

[Jun Wan Shin](#),^{1,2} [Kyung-Hee Kim](#),^{1,2} [Michael J. Chao](#),^{1,2} [Ranjit S. Atwal](#),^{1,2} [Tammy Gillis](#),¹ [Marcy E. MacDonald](#),^{1,2,3} [James F. Gusella](#),^{1,3,4} and [Jong-Min Lee](#)^{1,2,3}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

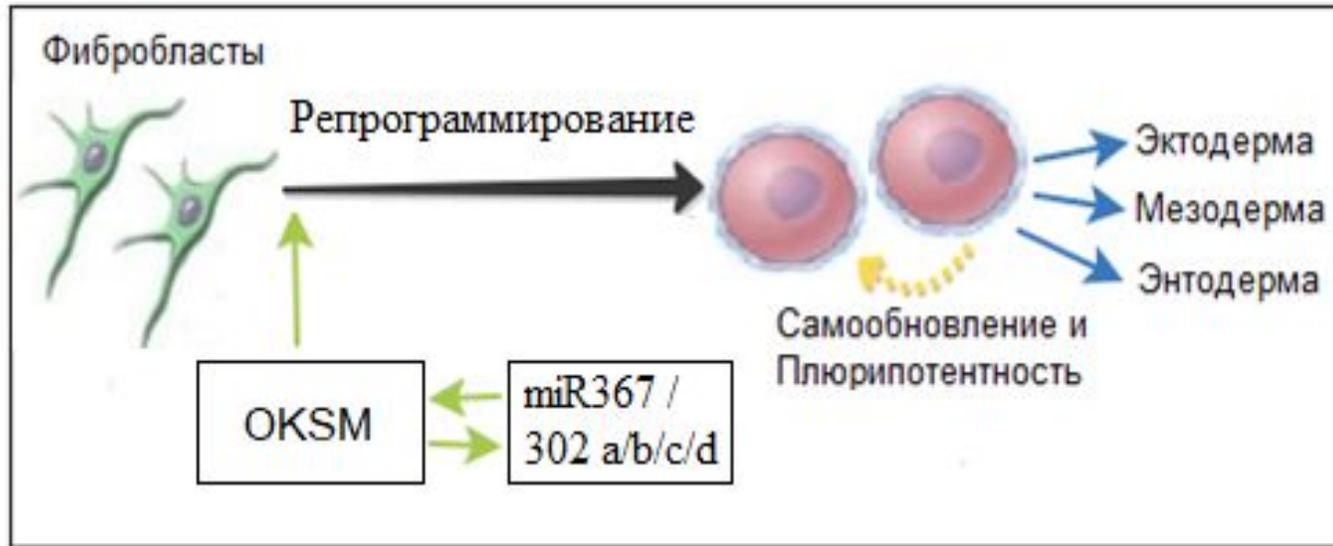
Methods Mol Biol. 2020;2056:269-284. doi: [10.1007/978-1-4939-9784-8_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9784-8_17).

Gene Therapy for Huntington's Disease Using Targeted Endonucleases.

[Dabrowska M](#)¹, [Olejniczak M](#)².

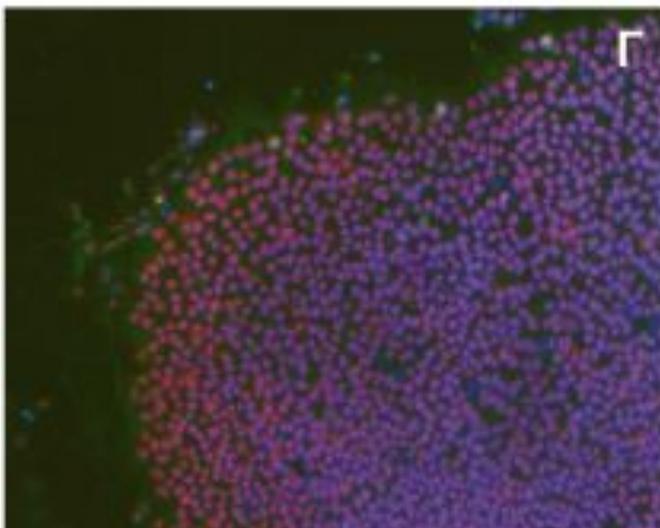
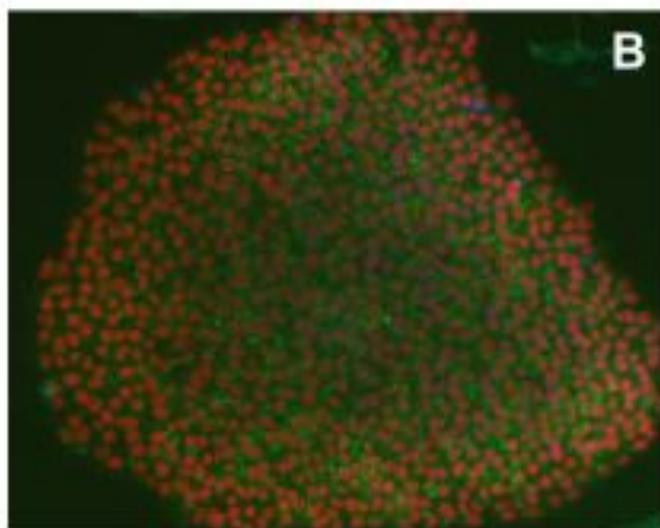
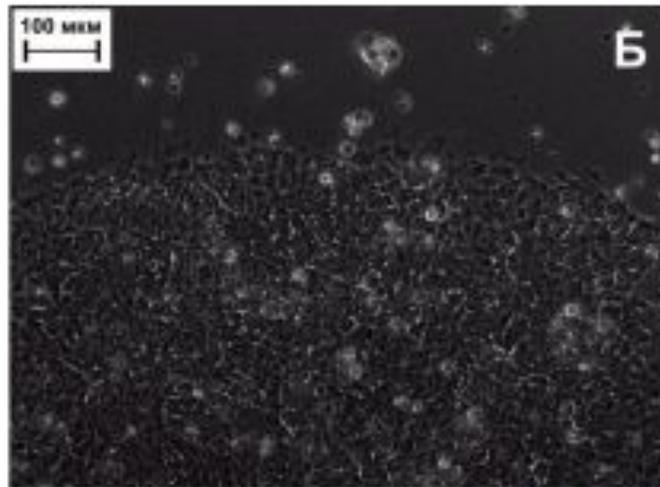
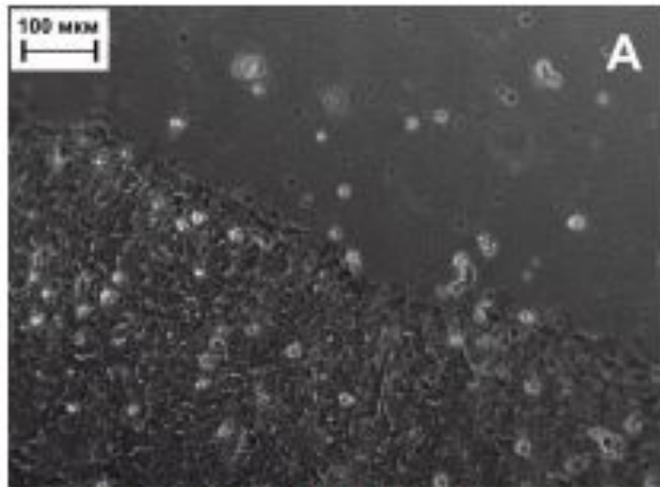


Репрограммирование Соматических клеток в ИПСК

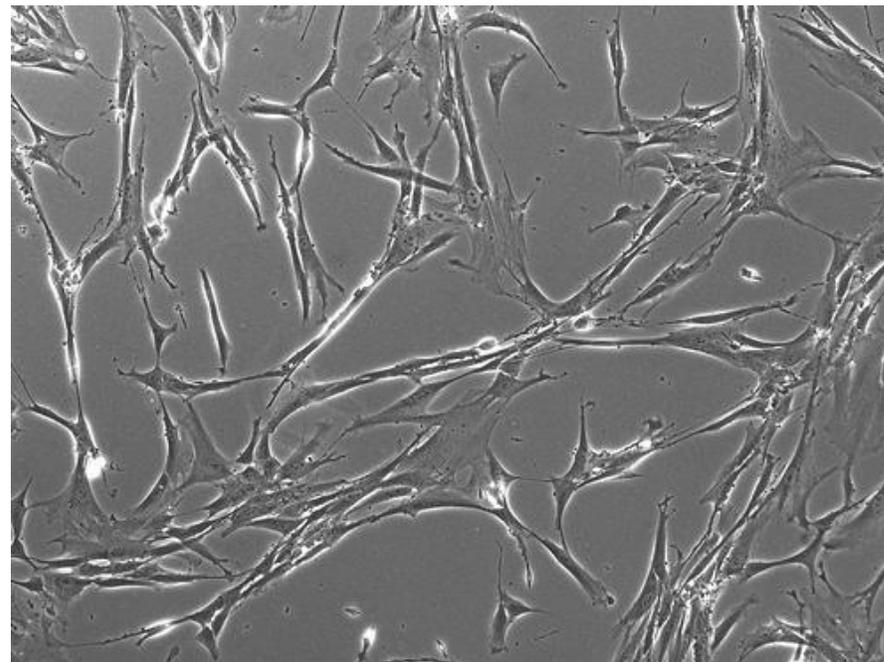


1. Интегрирующий метод состоит в использовании вирусного вектора на основе ретровируса.
2. Не интегрирующие методы включают в себя использование: вирусного вектора, на основе Сендай вируса (SeV), эписомальных плазмид (Epi), а также РНК (miRNA и mRNA).

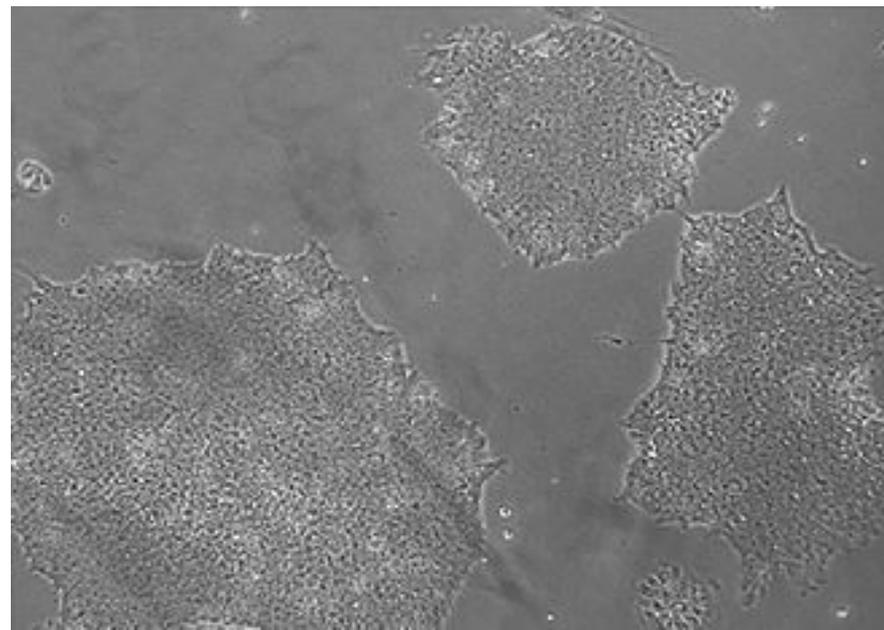
Краткая схема репрограммирования соматических клеток (фибробластов) в индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК).



Фибробласты



ИПСК



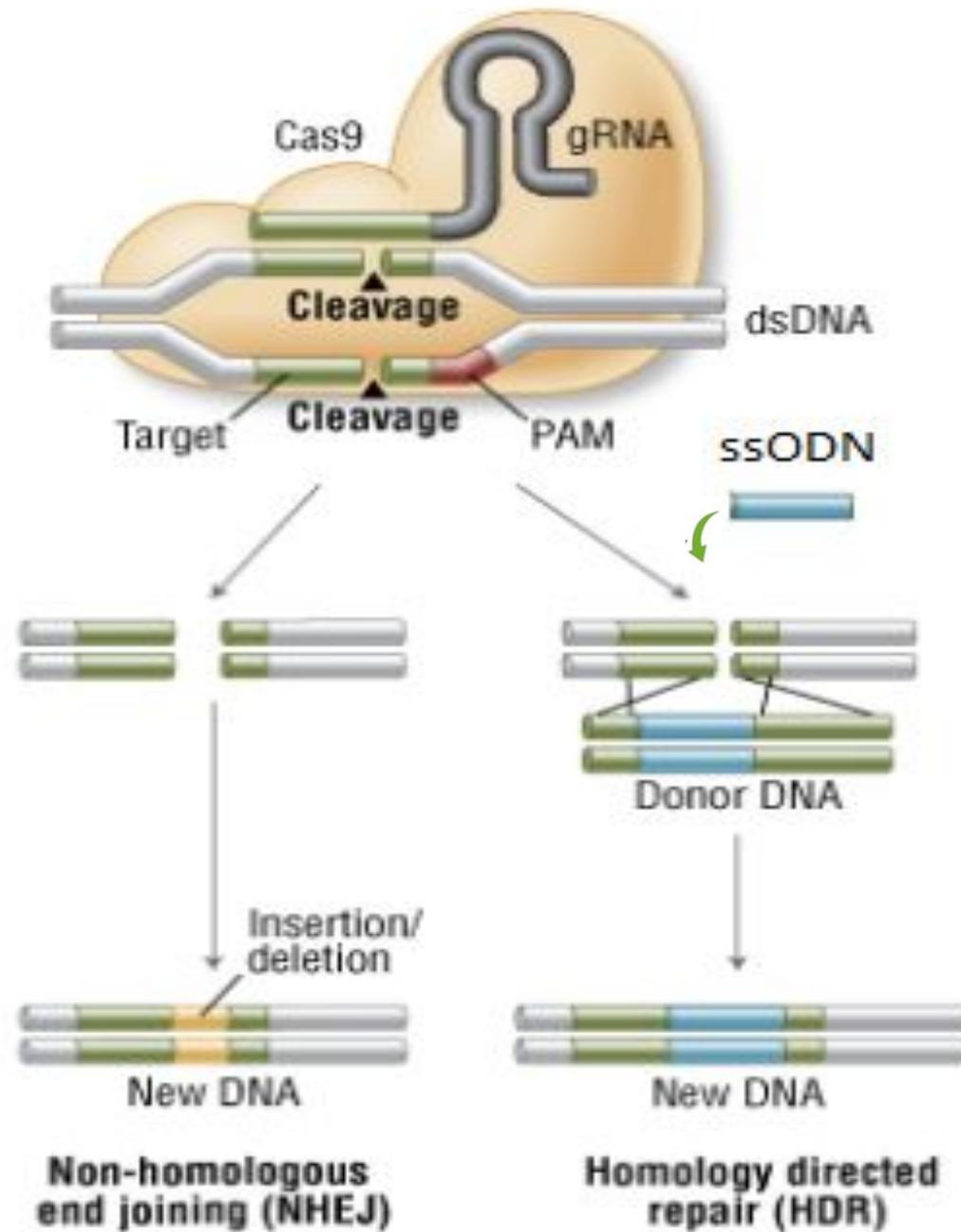
ЭС и ИПС клетки человека в культуре.

А. Колония ЭС клеток человека, линия HUES9. Б. Колония ИПС клеток, полученных из фибробластов здорового донора. Увеличение X200.

В, Г. Иммуноцитохимическое окрашивание клонов ИПС клеток на маркеры плюрипотентности. В. Oct4 (красный), SSEA4 (зеленый), DAPI (голубой).

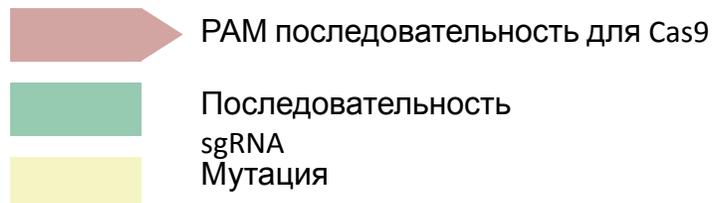
Г. Sox2 (красный), TRA-1-61 (зеленый), DAPI (голубой). Увеличение X100.

CRISPR/Cas9



Дизайн sgRNA и полученные плазмиды

GAGGGTAAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATA
CTCCCATTTTAATTCGTGTCACSTTCTTAAAGTAAGACAAGAGTCAAAAGGACСТААТАСGGACCGTGGTAATTTCTTTTATAGTAGAAACCACAАAGGATACTACTTAT.



для БГ

T1: GGCCTTCATCAGCTTTTCCAggg,

T2: GGAAGGACTTGAGGGACTCGAagg,

T3: GGCTGAGGAAGCTGAGGAGGcgg,

T4: GCCCCGCCGCCACCCGGCCcgg

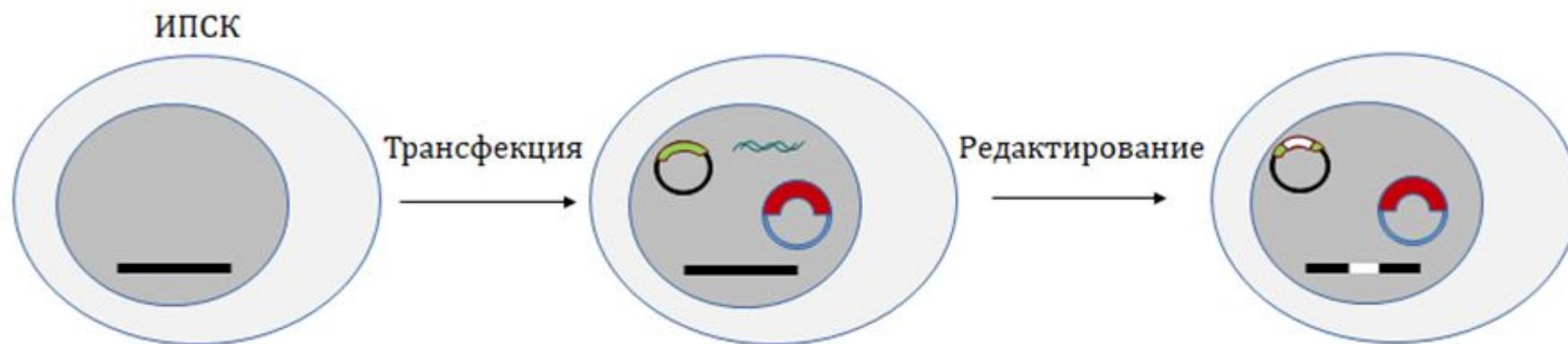
and control gRNA: ACCGGAAGAGCGACCTCTTCT (PAM sequence are shown in lowercase).

Дизайн ssODN



- ssODN-#1
- ssODN-#2
- ssODN-#3
- ssODN-sa

Схема экспериментов



 Плазмида ν GEM-TA-CFTR

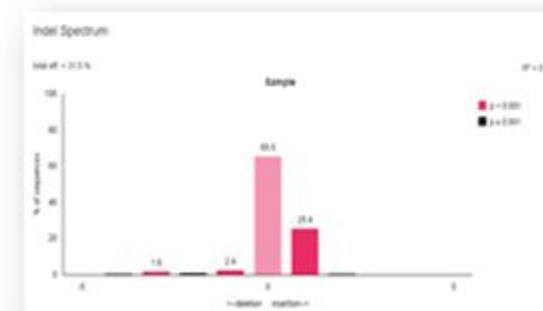
 Плазмида Cas9+sgRNA

 Геномная ДНК

 ssODN (одноцепочечный олигонуклеотид)

Оценка инделов
и вставок

TIDE + TIDER

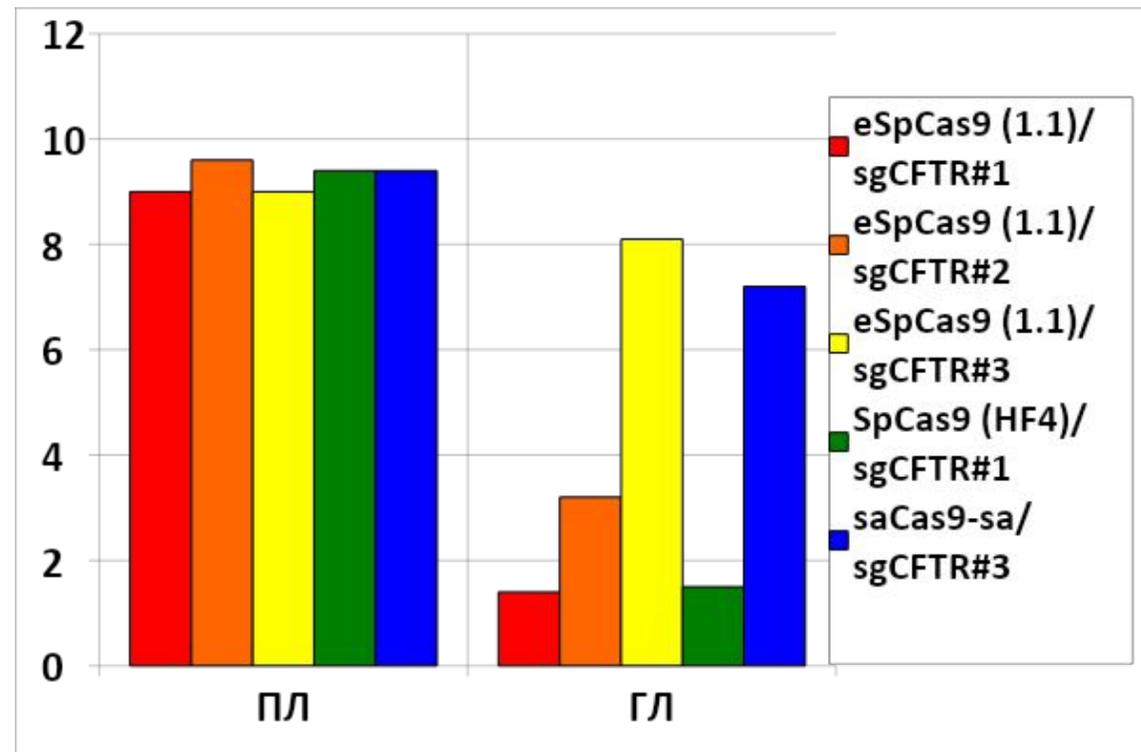


Результаты

- eSpCas9(1.1)-sg#1 (ПЛ – 9%, ГЛ – 1,4%)
- eSpCas9(1.1)-sg#2 (ПЛ – 9,6%, ГЛ – 3,2%)
- eSpCas9(1.1)-sg#3 (ПЛ – 9%, **ГЛ – 8,1%**)

- SpCas9(HF4)-sg#1 (ПЛ – 9,4%, ГЛ – 1,5%)

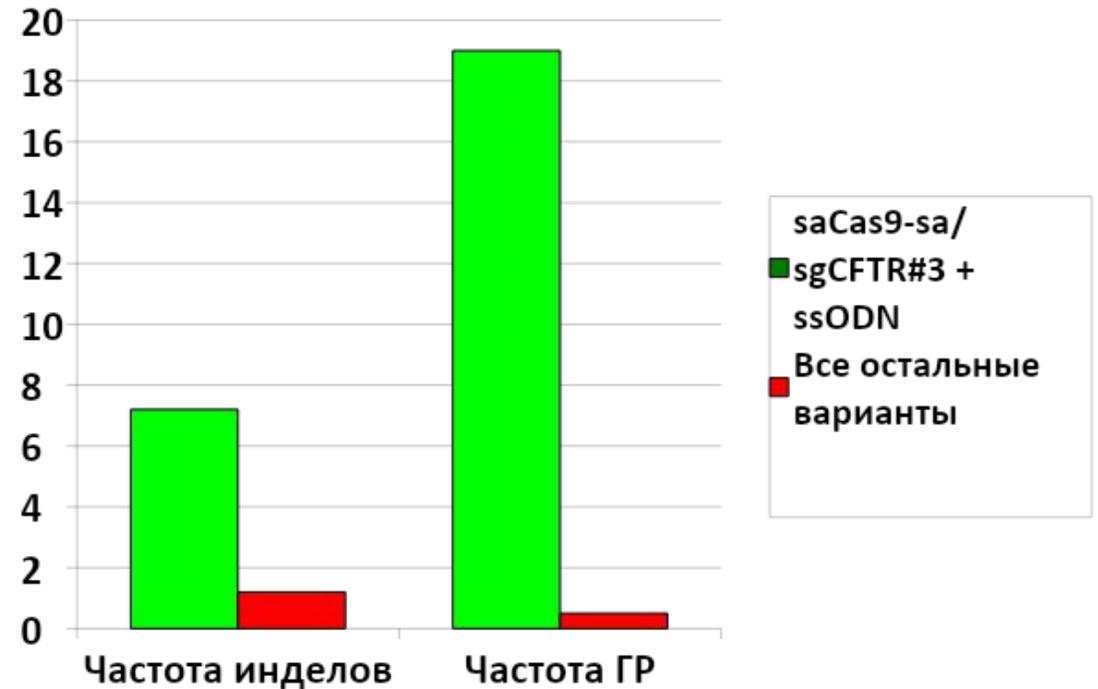
- saCas9-sa_sg#3 (ПЛ – 9,4%, **ГЛ – 7,2%**)



ПЛ- Плазмидный Локус ГЛ- Геномный Локус

Частота Инделов и Гомологичной Рекомбинации (ГР)

- Наиболее эффективная комбинация –
saCas9-sa_sgCFTR#3 и ssODN-saCFTR
 - инделы – 7,2% (0,6%-22,5%)
 - ГР – 19% (17%-21,7%)
- Остальные варианты редактирования:
 - инделы – от 1,2% до 3,2%
 - ГР – от 0% до 0,5%



Роль Астроцитов в БГ

Adv Exp Med Biol. 2019;1175:355-381. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_14.

Astrocytes in Huntington's Disease.

Gray M¹.

Стало ясно, что другие типы клеток, включая астроциты, играют важную роль в патогенезе HD. Мутантный белок НТТ (mНТТ) присутствует в нейрональных и ненейронных клеточных типах всей нервной системы.

Генетическая нестабильность ИПСК

В настоящее время одной из главных проблем применения ИПСК в качестве клеточной терапии является их генетическая нестабильность (образование мутаций в ходе репрограммирования и культивирования), которая может привести к образованию злокачественных опухолей и появляется из-за:

- 1) Ранее существовавших вариации в родительских соматических клетках, которые могут проявляться в процессе образования ИПСК
- 2) Мутации, вызванных репрограммированием и которые происходят в процессе репрограммирования.
- 3) Индуцированные пассажем мутации, возникающие при длительном культивировании.

Поэтому все исследования связанные с ИПСК проводят либо на клеточных культурах, либо на животных (доклинические исследования).

НЕТ НИ ОДНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

**Спасибо за
внимание!**