

Перспективы и ограничения редактирования кариотипа и хромосомной терапии

Кашеварова А.А.^{1*}, Серов О.Л.², Лебедев И.Н.¹

¹ — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск

² — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

*e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Хромосомные болезни — генетически обусловленные заболевания, проявляющиеся разнообразными симптомами. Несмотря на высокую частоту хромосомных аномалий и их клиническую значимость, подходов к эффективному лечению пациентов, а тем более, к коррекции крупных хромосомных дефектов не существует. Предложено несколько способов элиминации мутантной хромосомы из клетки: через спонтанную потерю кольцевой хромосомы при культивировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и путем удаления ее центромеры с использованием системы CRISPR/Cas9. Показано, что кольцевую хромосому можно создать искусственно при использовании CRISPR/Cas9-технологии. Нами апробирован первый подход по элиминации кольцевой хромосомы и показано, что при культивировании ИПСК кольцевая хромосома 13 образует стабильные фрагменты, тогда как кольцевая хромосома 22 неизменно наследуется в ряду клеточных поколений. Очевидно, потеря кольцевой хромосомы в ИПСК не является строго универсальным процессом, а технологии, которые могут лечь в основу хромосомной терапии, требуют значительной доработки.

Ключевые слова: коррекция кариотипа, хромосомная терапия, ИПСК, кольцевая хромосома, CRISPR/Cas9.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10231.

Perspectives and limitations of karyotype editing and chromosome therapy

Kashevarova A.A.^{1*}, Serov O.L.², Lebedev I.N.¹

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk

² — Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk;

*e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Chromosome diseases are genetically determined diseases, manifested by a variety of symptoms. Despite the high frequency of chromosome abnormalities and their clinical significance, there are no approaches to effective treatment of patients and to the correction of large chromosome defects. Several methods for the eliminating of the mutant chromosome from the cell are proposed: through spontaneous loss of the ring chromosome during the culturing of induced pluripotent stem cells (iPSC) and by removing its centromere using the CRISPR/Cas9 system. It was shown that the ring chromosome can be created using CRISPR/Cas9 technology. We tested the first approach for ring chromosome elimination and showed that during the culturing of iPSCs the ring chromosome 13 formed stable fragments, while the ring chromosome 22 was transmitted unchanged. Obviously, the loss of the ring chromosome in iPSCs is not strictly a universal process, and the technologies that can form the basis of chromosome therapy require considerable improvement.

Key words: karyotype correction, chromosome therapy, induced pluripotent stem cell (iPSC), ring chromosome, CRISPR/Cas9.

Введение

Индивиды с аномальным числом или структурой хромосом имеют различные клинические отклонения. Несмотря на высокую частоту хромосомных аномалий и их клиническую значимость, подходов к эффективному лечению пациентов, а тем более, к коррекции крупных хромосомных дефектов не существует. Предложены и активно дискутируются несколько способов элиминации мутантной хромосомы из клетки: через спонтанную потерю кольцевой хромосомы при культивировании

ИПСК [1] и путем удаления ее центромеры с использованием системы CRISPR/Cas9 [2, 3].

В настоящем обзоре рассматриваются кольцевые хромосомы и их нестабильность в ходе клеточных делений, возможности искусственного замыкания хромосомы в кольцо, подходы к коррекции крупных хромосомных дефектов через спонтанную потерю кольцевой хромосомы в ИПСК и посредством элиминации мутантной хромосомы при использовании системы CRISPR/Cas9.

Формирование кольцевых хромосом и их естественная нестабильность

Кольцевые хромосомы у человека описаны для всех хромосом набора [6]. Как правило, они возникают *de novo* посредством слияния концов двух двунитевых разрывов, теломер/субтеломер или при сочетании инвертированной дупликации и делеции как в митозе, так и в мейозе [7]. Стабильность кольцевых хромосом варьирует. Они считаются стабильными, если вторичные аберрации присутствуют в менее чем 5% делящихся клеток. Только у 26% пациентов кольцевые хромосомы (производные хромосом 1—12) проявляли стабильность в клеточном цикле; эта доля увеличивалась до 50% в случаях, когда пациенты были носителями кольцевых хромосом меньших размеров [8]. Вследствие явления динамического тканеспецифичного мозаицизма, носители кольцевых хромосом, как правило, являются мозаиками по различным вторичным хромосомным аберрациям: дицентрическим кольцам, двум или трем моноцентрическим или дицентрическим кольцам в одной и той же клетке, разорванным кольцам и фрагментам хромосом [8—11]. Предполагается, что чем больше кольцевая хромосома, тем больше сестринских хроматидных обменов она претерпевает, и в результате увеличивается вероятность разрыва хромосом, в то время как небольшие хромосомы чаще теряются. Однако в ряде других работ связи между размером кольцевой хромосомы и её стабильностью зарегистрировано не было [12, 13].

Спонтанная элиминация кольцевых хромосом в ИПСК

В 2014 году появилось первое сообщение о том, что в основу коррекции хромосомных дефектов может лечь феномен потери кольцевой хромосомы в процессе репрограммирования фибробластов в ИПСК [1]. Необычный эффект был обнаружен авторами при попытке получить ИПСК-модель синдрома Миллера-Дикера (OMIM 247200) при репрограммировании фибробластов пациентов с кольцевой хромосомой 17 и признаками данного заболевания. В фибробластах кожи пациента отмечался мозаицизм: 95% клеток имели кариотип 46,XY,r(17), оставшиеся 5% клеток были моносомными или с вторичными производными кольца. Проанализировав шесть ранних пассажей ИПСК, Bershteyn с соавт. обнаружили, что четыре из шести клонов были нормальной морфологии, демонстрировали активную пролиферацию и имели численно и структурно нормальный кариотип, в то время как остальные клоны с r(17) прекратили рост. Было показано, что стабильные клоны имели 46 хромосом без r(17) в 85—100% клеток, в сравнении с менее 15% в нестабильных клонах. Эти результаты свидетельствуют о том, что наличие кольцевой хромосомы было несовместимо с процессом репрограммирования и/или поддержанием статуса стволовых клеток. SNP-анализ показал, что кольцевая хромосома была потеряна и заменена дополнительной копией ее нормального гомолога. На основании этих данных авторы предположили, что ИПСК может служить эффективной системой избавления

от кольцевой хромосомы. Для проверки универсальности данной идеи для разных хромосом набора Bershteyn с соавт. репрограммировали в ИПСК фибробласты двух других пациентов с кольцевой хромосомой 13. Наличие r(13) в исходных фибробластах было подтверждено в 80—100% клеток. К девятому пассажиру шесть из девяти клонов ИПСК с кольцевой хромосомой 13 обнаруживали преимущественно нормальный кариотип.

Обнаружение неожиданного механизма для элиминации аберрантных хромосом во время репрограммирования впервые открыло возможности для развития такого направления, как хромосомная терапия. В связи с этим возникает ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения: во-первых, насколько универсален и воспроизводим данный механизм для других хромосом набора, кроме хромосом 13 и 17; во-вторых, насколько просто или сложно искусственно замкнуть хромосому с мутацией в кольцо, если распространить предложенный метод на хромосомы с делециями, дупликациями или с моногенными мутациями. Кроме того, данный подход имеет некоторые ограничения, заключающиеся, прежде всего, в гомозиготизации рецессивных мутаций и нарушении импринтинга, если мутация или импринтированная область локализованы на гомологе.

Нами была инициирована работа по изучению стабильности кольцевых хромосом при культивировании ИПСК, полученных из фибробластов кожи пациентов с кольцевыми хромосомами 13 и 22. Было получено 2 линии ИПСК с r(13): iTAF6-4 и iTAF6-13 (iTAF — induced Tomsk Adult Fibroblast). Показано, что в репрограммированных клетках на пассаже 5 преимущественно сохраняется их исходный кариотип: кольцевая хромосома 13 обнаружена в 90% клеток линии iTAF6-4 (суммарно 200 клеток) и в 87% клеток линии iTAF6-13 (суммарно 154 клетки). При этом в остальных клетках главным образом регистрируется моносомия по хромосоме 13. Потеря кольца лишь в 10% клеток может свидетельствовать о невысоких темпах спонтанной элиминации кольцевой хромосомы 13 по результатам FISH-анализа. В то же время, по уточняющим данным стандартного цитогенетического анализа (89 клеток), в 73—95% ИПСК присутствует не кольцевая хромосома, а маркерная (46,XY,-13,+mar), содержащая центромерный участок хромосомы 13, с потерей большей части хромосомного материала. Моносомия по хромосоме 13 была зарегистрирована лишь в 4—9% клеток (неопубликованные данные). Эти данные указывают на повышенную нестабильность r(13) при репрограммировании или на ранних пассажах в ИПСК, которая приводит в большей степени к фрагментации, но не элиминации кольцевой хромосомы, в отличие от результатов Bershteyn с соавт. [1]. По-видимому, даже для одной и той же хромосомы механизм не является строго универсальным. Возможно, условия репрограммирования фибробластов и культивирования ИПСК у данной группы исследователей некоторым образом благоприятствовали спонтанной элиминации r(13) и амплификации нормального гомолога.

Или же размер самого кольца может предрасполагать либо к его потере, либо к фрагментации.

Из фибробластов кожи пациентки с г(22) также получено две линии ИПСК: iTAF5-29 и iTAF5-32. В обеих линиях, как по результатам FISH-анализа, так и по данным метафазного анализа, клетки с кольцевой хромосомой 22 устойчиво сохраняются и составляют абсолютное большинство. По данным FISH-анализа, к пассажу 11 для линии iTAF5-29 и к пассажу 9 для линии iTAF5-32 доля моносомных клеток не превышает 12% и 6% соответственно, а остальные клетки несут кольцевую 22 [5]. Метафазный анализ к пассажу 23 для линии iTAF5-29 и к пассажу 17 для линии iTAF5-32 выявил кариотип 46,XX,r(22) в 82% и 86% клеток, а клетки с моносомией составили 15% и 7%, соответственно. Таким образом, г(22) стабильно сохраняется при продолжительном культивировании ИПСК.

Искусственное замыкание хромосомы в кольцо

В рамках описанного Bershteyn с соавт. механизма элиминации кольцевой хромосомы в ИПСК [1] также возник вопрос об искусственном замыкании мутантной хромосомы в кольцо с целью последующей коррекции кариотипа. Так, в апреле 2018 года появилась публикация о том, что с использованием CRISPR-опосредованного подхода авторам удалось получить кольцевую хромосому 18 в клетках НЕК293Т (2 из 113 метафаз) [4]. Нами также разрабатывается технология замыкания хромосомы в кольцо путем встраивания трансгенных конструкций в терминальные области длинного и короткого плеч хромосомы 3 при использовании системы CRISPR/Cas9, между которыми в дальнейшем будет проведена рекомбинация. Стоит отметить, что создание подобных конструкций и их интеграция в хромосому представляют определенные сложности, требуют больших затрат усилий и времени. В связи с этим, а также учитывая не совсем предсказуемую элиминацию кольцевой хромосомы в ИПСК, данный подход в целях хромосомной терапии представляется мало востребованным. Однако создание стабильных линий с кольцевыми хромосомами дает прекрасную возможность дальнейшего изучения на модельных клеточных системах эффектов этих генетических аномалий.

Элиминация хромосомы с использованием системы CRISPR/Cas9

В 2017 году был опубликован еще один механизм элиминации целой хромосомы, который потенциально также может быть использован для удаления из ИПСК мутантной хромосомы с тем, что далее произойдет спонтанная амплификация оставшегося нормального гомолога. В работах Adikusuma и Zuo с соавт. было показано, что с использованием системы CRISPR/Cas9 можно удалить целую хромосому как *in vitro*, так и *in vivo*, внося разрывы в участки ДНК по обе стороны от центромеры [2, 3]. Ожидаемое в таком случае удаление цент-

ромеры приведет к потере хромосомы и, возможно, восстановлению нормального кариотипа. Хромосомные перестройки успешно генерируются с использованием CRISPR/Cas9-технологии в настоящее время. Так, делеции, дупликации и инверсии участка хромосомы 6 мыши, содержащего ген *Cntn6*, были получены у 11 из 41 мыши (25%) путем микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот [14]. С использованием генно-инженерных методов удалось объединить 16 хромосом дрожжей *S. cerevisiae* и получить линии с одной и двумя хромосомами, которые мало влияли на жизнеспособность клеток *in vitro* [15].

Таким образом, несмотря на то, что хромосомная терапия является крайне востребованным направлением медицины, технологии, которые могут лечь в ее основу, только начинают развиваться и адаптироваться. Очевидно, что один и тот же подход не всегда может быть использован для коррекции разных кариотипов.

Список литературы

1. Bershteyn M, Hayashi Y, Desachy G et al. Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2014;507(7490):99-103.
2. Adikusuma F, Williams N, Grutzner F et al. Targeted Deletion of an Entire Chromosome Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther*. 2017;25(8):1736-1738.
3. Zuo E, Huo X, Yao X et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination. 2017;18(1):224.
4. Moller HD, Lin L, Xiang X et al. Circularization of genes and chromosome by CRISPR in human cells. *bioRxiv* 304493; doi: <https://doi.org/10.1101/304493>
5. Кашеварова АА, Беляева ЕО, Никонов АМ и др. Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках с кольцевой хромосомой как основа хромосомной терапии. 2017;162):18-26. (Kashevarova AA, Belyaeva EO, Nikonov AM et al. Spontaneous chromosomal instability in cells with a ring chromosome as the basis for chromosomal therapy. *Medical genetics*. 2017;162):18-26).
6. Gardner RJ, Amor DJ. Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling. *Oxford monographs on medical genetics*. 2018;1268.
7. Prityazhnyuk IE, Menzorov AG. Ring chromosomes: from formation to clinical potential. *Protoplasma*. 2018;255(2):439-449.
8. Kosztolanyi G. Does «ring syndrome» exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring auto-some. *Hum Genet*. 1987;75(2):174-179.
9. Kosztolanyi G. The genetics and clinical characteristics of constitutional ring chromosomes. *J Assoc Genet Technol*. 2009;35(2):44-48.
10. Sodre CP, Guilherme RS, Meloni VF et al. Ring chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res*. 2010;9:134-143.
11. Conlin LK, Kramer W, Hutchinson AL et al. Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients. *J Med Genet*. 2011;48(1):1-9.
12. Kistenmacher ML, Punnett HH. Comparative behavior of ring chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1970;22:304-331.
13. Guilherme RS, Meloni VF, Kim CA et al. Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Medical Genetics*. 2011;12:171.
14. Korablev AN, Serova IA, Serov OL. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the Contactin-6 gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. *BMC Genet*. 2017;18(1):112.
15. Liti G. Yeast chromosome numbers minimized using genome editing. *Nature*. 2018; <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05309-4>.