

Эпигеномное редактирование потенциальных энхансеров генов риска шизофрении: подходы к оптимизации генетических конструкций

Абашкин Д.А., Куришев А.О., Смирнова С.В., Карпов Д.С., Голимбет В.Е.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья,
Москва, Россия

Резюме. Наследственные факторы вносят существенный вклад в развитие шизофрении. Однако, несмотря на многолетние исследования, генетическая архитектура и механизмы участия генетических факторов в развитии шизофрении изучены недостаточно. С помощью полногеномного анализа генетических ассоциаций в различных некодирующих областях генома, включая энхансеры генов, обнаружено множество локусов, ассоциированных с повышенным риском развития шизофрении. В ходе анализа пространственной структуры генома нами выявлено взаимодействие этих энхансеров с промоторными областями генов, участвующих в метаболизме нейронов. Чтобы более детально исследовать функции этих генов и участие энхансеров в их регуляции, мы получили плазмидные и лентивирусные конструкции функционально активного репрессора транскрипции на основе системы CRISPR/SpyCas9, а также эндонуклеазной системы. Обсуждается использование этих конструкций в исследованиях функций энхансеров и генов, связанных с метаболизмом и регуляцией экспрессии генов в нейронах.

Ключевые слова: шизофрения, энхансеры, CRISPR/SpyCas9

Epigenome editing of the potential enhancers of the schizophrenia risk genes: approaches for optimization of the genetic constructs

Abashkin D.A., Kurishev A.O., Smirnova S.V., Karpov D.S., Golimbet V.E.
Mental Health Research Center, Moscow, Russia

Summary. Hereditary factors contribute significantly to the development of schizophrenia. However, despite many years of research, the genetic architecture and mechanisms of the participation of genetic factors in the development of schizophrenia are not well understood. Genome-wide analyzes of genetic associations in various non-coding regions of the genome, including gene enhancers, revealed many loci associated with an increased risk of schizophrenia. In the course of the analysis of the spatial structure of the genome, we revealed the interaction of these enhancers with the promoter regions of genes involved in the metabolism of neurons. To study in more detail the functions of these genes and the participation of enhancers in their regulation, we obtained plasmid and lentiviral constructs of a functionally active transcription repressor based on the CRISPR / SpyCas9 system, as well as the endonuclease system. The use of these constructs in studies of the functions of enhancers and genes associated with the metabolism and regulation of gene expression in neurons is discussed.

Keywords: schizophrenia, enhancers, CRISPR / SpyCas9

Актуальность. Известно, что в развитие шизофрении существенный вклад вносят наследственные факторы. Однако, несмотря на многолетние исследования, генетическая архитектура и механизмы участия генетических факторов в развитии заболевания изучены недостаточно. В соответствии с результатами полногеномных анализов генетических ассоциаций выявлено множество локусов ДНК, ассоциированных с повышенным риском развития шизофрении [1,2]. Наибольшая часть этих локусов картирована в некодирующих областях генома и пересекается с областями, отвечающими за регуляцию экспрессии генов, в том числе энхансерами, которые способны контролировать активность генов, находясь от них на значительном расстоянии. Однако при участии специальных белковых комплексов энхансеры могут быть сближены в пространстве с промоторами регулируемых ими генов. Можно предположить, что об-

наруженные полиморфизмы в энхансерах, путем изменения их активности, опосредуют изменение экспрессии генов, имеющих отношение к функционированию нейронов. Методами анализа пространственной структуры генома нами получены данные о специфичных для нейрональных клеток взаимодействиях между энхансерами и промоторами генов.

Целью настоящей работы является разработка подхода к исследованию контактов между энхансерами и промоторами, имеющими отношение к активности нейронов на основе репрессорной системы CRISPR/SpyCas9.

Материалы и методы. Дизайн плазмидных конструкций проводили с помощью программ VectorNTI (Invitrogen) и SnapGene. Мишени системы CRISPR/SpyCas9 подбирали с помощью программы CRISPOR. Плазмидные конструкции получали стандартными методами классического молекулярного клонирования, используя эн-

донуклеазы рестрикции II и IIS классов и лабораторные штаммы *E.coli* DH5 α и XL1Blue. Наличие и корректность последовательности клонированных фрагментов определяли рестрикционным анализом с последующим секвенированием. Использовали стандартные протоколы трансфекции линии клеток SK-N-SH. Степень метилирования промоторных областей исследуемых генов определяли с помощью метода метил-чувствительной ПЦР в реальном времени с последующим плавлением высокого разрешения (MS-HRM). Упаковку лентивирусных векторов в вирусные частицы проводили с помощью линии HEK293T с использованием вспомогательных плазмид системы 3-го поколения.

Результаты и их обсуждение. Одним из подходов исследования контактов между энхансерами и промоторами является использование репрессоров транскрипции на основе системы CRISPR/SpyCas9, способных к метилированию ДНК. На сегодняшний день самый сильный из подобных репрессоров — это химерный белок, dCas9-KRAB-MeCP2, состоящий из крупель-ассоциированного домена (KRAB) и метил-СрG-связывающего белка (MeCP2) [3]. Методами молекулярного клонирования нами получена плазмидная конструкция rdCas9-KRAB-MeCP2-Puro, кодирующая одновременно и направляющую РНК и репрессорный химерный белок dCas9-KRAB-MeCP2 в одной рамке с пурамицином-ацетил-трансферазой, обеспечивающей устойчивость клеток млекопитающих к пурамицину. В качестве контрольных мишеней репрессорной системы выбраны три энхансера, во-

влеченные в контроль экспрессии *EPHX2*, *FGFR1* и *VPS37B*. Эти энхансеры находятся в регионах сцепления с шизофренией, выявленных в полногеномных исследованиях. На каждый из энхансеров подобраны от 2 до 6 пар спейсеров, нацеленных на участки, обогащенные гистоновой меткой H3K27Ac. Полученными конструкциями трансфицировали клетки линии SK-N-SH и после селекции на пурамицине выделяли из них геномную ДНК для последующего анализа MS-HRM. На рис. 1. представлены результаты MS-HRM анализа в случае энхансера *EPHX2*. Согласно полученным результатам в случае репрессора, использующего пару спейсеров r3 детектируется определенный уровень метилирования участка энхансера гена *EPHX2*, превышающий фоновый уровень, обеспечиваемый пустым вектором. Однако этого уровня недостаточно, чтобы блокировать функционирование репрессируемого энхансера. Мы предположили, что это связано с кратковременным действием CRAB-репрессора, поскольку плазида теряется в ходе делений клеток и экспрессия, кодируемых ею генов подавляется через некоторое время. Чтобы обеспечить длительное действие репрессора, его ген клонировали в лентивирусную конструкцию с репортерным зеленым флуоресцентным белком (lentiZ-GFP). Вторая лентивирусная конструкция с репортерным геном красного флуоресцентного белка несла гены двух направляющих РНК (pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP, Addgene #57823). Кроме того, нами получены лентивирусные конструкции с репрессорной системой CRISPR/SpyCas9 нацеленные на промоторные области генов *DRYSL2*, *MAD1L1* и *GATAD2*, чтобы непосредственно за счет подавления транскрипции нарушить функции эти генов. В настоящее время получены линии стабильно экспрессирующие репрессорный белок, а также направляющие РНК против энхансера *EPHX2* в линии клеток SK-N-SH.

Помимо энхансеров описаны факторы транскрипции, полиморфизмы в которых ассоциированы с повышенным риском развития шизофрении. Один из подходов к исследованию функций этих факторов в жизнедеятельности нейронов — это нарушение их экспрессии путем делеции промоторной области или самого гена. Мы получили плазмиды эндонуклеазной CRISPR/SpyCas9 системы на основе плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (AddGene #48138), нацеленной против генов *ASCL1* и *EGR1* и промоторных областей генов *ZNF180*, *ZNF281* и *ZNF536*. Полученные конструкции могут быть использованы для получения редактированных нейрональных линий с нарушенной функцией этих факторов, что позволит установить их роль в жизнедеятельности нейронов и связь с патогенезом шизофрении.

Выводы. Получены плазмиды и лентивирусные вектора кодирующие компоненты сильной репрессорной системы на основе белка dCas9-KRAB-MeCP2 и направленные против энхансеров генов *EPHX2*, *FGFR1* и *VPS37B* в регионах, сце-

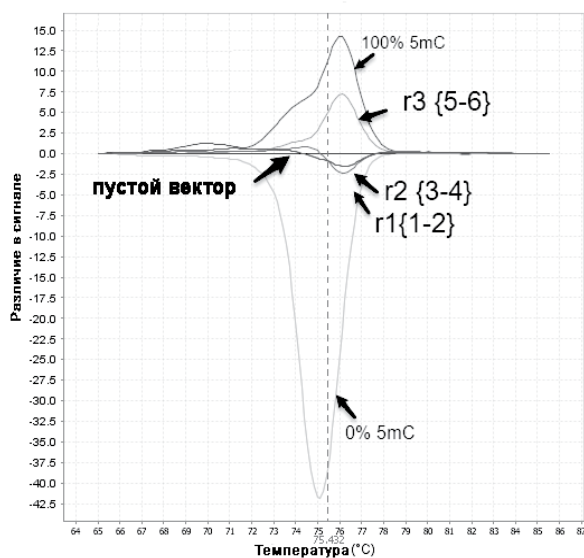


Рис.1. Результаты MS-HRM анализа энхансера гена *EPHX2*. r1, r2 и r3 представляют репрессоры, использующие различные пары спейсеров против энхансера.

Fig. 1. Results of the MS-HRM analysis of the enhancer of the *EPHX2* gene. r1, r2 and r3 represent repressors using different pairs of spacers against the enhancer.

пленных с шизофренией. Показано наличие слабой ДНК-метилирующей активности репрессора, экспрессируемого с плазмиды. Получены линии SK-N-SH, стабильно экспрессирующие репрессор и направляющие РНК против энхансера *EPHX2*. Получены плазмидные конструкции для делеции

генов *ASCL1* и *EGR1* и промоторных областей генов *ZNF180*, *ZNF281* и *ZNF536*, кодирующих нейрональные факторы транскрипции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-015-00501.

Список литературы/References

1. Pardiñas A.F., Holmans P., Pocklington A.J., Escott-Price V., Ripke S., Carrera N., et al., Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nat Genet.* 2018; 50:381–389. doi: 10.1038/s41588-018-0059-2.
2. Ripke S., Neale B.M., Corvin A., Walters J.T.R., Farh K.-H., Holmans P.A., et al. Biological Insights from 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature.* 2014; 511:421–27. doi: 10.1038/nature13595.
3. Yeo N.C., Chavez A., Lance-Byrne A., Chan Y., Menn D., Milanova D., Kuo C.C., et al. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat Methods.* 2018;611–616. doi: 10.1038/s41592-018-0048-5.

Сведения об авторах

Абашкин Дмитрий Антонович — младший научный сотрудник лаборатории клинической генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья. E-mail: dimabashkin@gmail.com.

Куришев Артемий Олегович — лаборант-исследователь лаборатории клинической генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья. E-mail: kurishartt@gmail.com.

Смирнова Светлана Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории клинической генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья. E-mail: vsmirnov64@mail.ru.

Карпов Дмитрий Сергеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья. E-mail: aleom@yandex.ru.

Голимбет Вера Евгеньевна — доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией клинической генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического здоровья. E-mail: golimbet@mail.ru