

DOI: 10.17650/2222-8721-2023-13-1-22-32



# Перспективы этиопатогенетического лечения болезни Гентингтона

О.Б. Кондакова<sup>1</sup>, С.В. Демьянов<sup>2</sup>, А.В. Красивская<sup>2</sup>, Г.В. Демьянов<sup>2</sup>, Д.И. Гребенкин<sup>1</sup>, Ю.И. Давыдова<sup>1</sup>, А.А. Лялина<sup>1</sup>, Е.Р. Радкевич<sup>2</sup>, К.В. Савостьянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России; Россия, 119991 Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1;

<sup>2</sup>ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России; Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Ольга Борисовна Кондакова [kondakova.ob@nczd.ru](mailto:kondakova.ob@nczd.ru)

Болезнь Гентингтона – тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся развитием двигательных, когнитивных и психических нарушений. Заболевание обусловлено увеличением числа тринуклеотидных CAG-повторов в гене *HTT* и продукцией мутантного белка гентингтина, обычно проявляется во взрослом возрасте, но в 5–10 % случаев описана также манифестация в детском и юношеском возрасте. Болезнь Гентингтона преимущественно затрагивает неостриатум, что вызывает характерную клиническую картину.

Наиболее перспективными подходами к этиотропной терапии болезни Гентингтона являются ряд ДНК- (CRISPR/Cas9-система) и РНК-направленных методов (антисмысловые олигонуклеотиды, РНК-интерференция), методы, непосредственно снижающие уровень мутантного гентингтина (молекулы-химеры), а также подходы, основанные на инактивации системы восстановления несоответствия ДНК с использованием фермента FAN1.

**Ключевые слова:** болезнь Гентингтона, геномное редактирование, SNP, антисмысловые олигонуклеотиды, РНК-интерференция, PROTAC, стволовые клетки, FAN1

**Для цитирования:** Кондакова О.Б., Демьянов С.В., Красивская А.В. и др. Перспективы этиопатогенетического лечения болезни Гентингтона. Нервно-мышечные болезни 2023;13(1):22–32. DOI: 10.17650/2222-8721-2023-13-1-22-32

## Prospects of etiopathogenetic treatment of Huntington's disease

O.B. Kondakova<sup>1</sup>, S.V. Demyanov<sup>2</sup>, A.V. Krasivskaya<sup>2</sup>, G.V. Demyanov<sup>2</sup>, D.I. Grebenkin<sup>1</sup>, Yu.I. Davydova<sup>1</sup>, A.A. Lyalina<sup>1</sup>, E.R. Radkevich<sup>2</sup>, K.V. Savostyanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 2 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

**Contacts:** Olga Borisovna Kondakova [kondakova.ob@nczd.ru](mailto:kondakova.ob@nczd.ru)

Huntington's disease is a serious inherited neurodegenerative disorder characterized by of motor, cognitive and psychiatric features. The disease is caused by an abnormally expanded CAG repeat expansion in the *HTT* gene and the production of mutant huntingtin protein.

The disease usually manifests in adulthood, but the manifestation in childhood and youth is also described, which is noted in 5–10 % of cases. The disease predominantly affects the neostriatum, resulting in a characteristic clinical picture.

The most promising approaches to etiotropic therapy of Huntington's disease are a number of DNA- (CRISPR/Cas9 system) and RNA-directed methods (antisense oligonucleotides, RNA interference), methods that directly reduce the level of mutant gentingtin (chimera molecules), as well as approaches based on inactivating the DNA mismatch repair system using the FAN1 enzyme.

**Keywords:** Huntington's disease, genome editing, SNP, antisense oligonucleotides, RNA interference, PROTAC, stem cells, FAN1

**For citation:** Kondakova O.B., Demyanov S.V., Krasivskaya A.V. et al. Prospects of etiopathogenetic treatment of Huntington's disease. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2023;13(1):22–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-8721-2023-13-1-22-32

## Введение

Болезнь Гентингтона (БГ), или хорea Гентингтона (OMIM: 143100), – тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся развитием двигательных, когнитивных и психических нарушений. БГ обусловлена патогенными вариантами гена *HTT*, расположенного на коротком плече хромосомы 4 (4p16.3) и кодирующего необходимый для многих биохимических процессов организма белок гентингтин. Заболевание обычно проявляется во взрослом возрасте, однако 5–10 % случаев описаны в детском и юношеском возрасте [1].

Распространенность БГ в мире варьирует очень широко, составляя в среднем 5,5:100000 [2–4], при этом самая высокая частота приходится на популяции европейского происхождения (Западная Европа, Северная Америка и Австралия): от 9,7:100000 до 17:100000 [5]. Самая низкая частота отмечается в странах Азии и Африки (Япония, Китай, Южная Корея, коренное население Южной Африки) и варьирует от 0,1:100000 до 2:100000 [5].

Гентингтин (wtHTT) – каркасный белок (скаффолд-белок), являющийся основой для создания многокомпонентных белковых комплексов, связывающий несколько сигнальных путей, объединяющий и контролирующий их. Таким образом, этот белок регулирует транскрипцию, функцию митохондрий, участвует в цитокинезе, аксональном транспорте, эндоцитозе, аутофагии, усиливает выработку нейротрофического фактора мозга (BDNF), обладает антиапоптотическими свойствами, играет важную роль в эмбриональном развитии нервной системы [6, 7].

Болезнь Гентингтона относится к болезням экспансии тринуклеотидных повторов и наследуется по аутосомно-доминантному типу. В норме в экзоне 1 гена *HTT* содержится менее 27 CAG-повторов. При БГ увеличение числа CAG-повторов приводит к появлению аномально длинного полиглутаминового тракта на N-конце гентингтина. Когда число CAG-триплетов превышает 39, наблюдается полная пенетрантность аллеля. Наличие от 36 до 39 повторов приводит к неполной пенетрантности заболевания. Количество триплетов от 27 до 35 свидетельствует о нестабильности генома, что может спровоцировать развитие заболевания у потомков. Чем больше число повторов в гене, тем раньше начинается и тяжелее протекает БГ. Число CAG-триплетов более 59 связано с проявлением болезни в возрасте до 21 года (ювенильная форма), более 89 – с инфантильной формой, дебютирующей до 10 лет [8, 9]. Пациенты с ювенильной формой заболевания чаще наследуют патогенный аллель от своих отцов [1].

Развитие симптомов заболевания в основном связано с действием мутантного гентингтина (mHTT), хотя в развитии БГ играют роль и ряд альтернативных патологических молекул. Так, помимо полноразмерного mHTT, в клетках находят также лишь его N-концевой фрагмент, содержащий глутамин. Недавние исследования показали, что данный фрагмент образуется в результате нарушенного сплайсинга, в ходе которого формируется короткая мРНК, содержащая только 1-й экзон, который и транслируется в полиглутаминовый тракт. Также при БГ мутантная мРНК подвергается так называемой RAN-трансляции, при которой трансляция начинается не со старт-кодона AUG (как в норме), а с другого кодона. При этом образуются 4 новых вида белка, содержащие уже не большое количество глутамина, а полиаланиновую, полисериновую, полилейциновую и полицистеиновую последовательности (polyAla, polySer, polyLeu, polyCys). Считается, что и сама мутантная мРНК может негативно влиять на организм [6, 7] (рис. 1).

Симптомы заболевания дебютируют на 4–5-м десятилетии жизни (в среднем в возрасте 45 лет), хотя возраст манифестации заболевания колеблется с 2 до 85 лет. У больных наблюдаются гиперкинезы, в основном представленные хореей и хореоатетозом, нарастающая деменция и изменения психики, проявляющиеся депрессией с суицидальными мыслями, манией и агрессивным поведением, бредом и галлюцинациями [10]. Ювенильная форма БГ отличается быстрым прогрессированием, атипичной клинической презентацией, поскольку психические и когнитивные нарушения задолго предшествуют появлению двигательной симптоматики. Для нее характерны гипокинетические симптомы (брадикинезия, ригидность, постуральная нестабильность), комбинация с дистонией на стадии моторных нарушений. У 50 % пациентов с инфантильной формой БГ отмечаются судороги и задержка развития. Морфологические изменения в мозге, которые выявляются при этой форме, гораздо тяжелее, чем при взрослой форме болезни [1].

При БГ поражаются многие структуры центральной нервной системы. Наибольшие изменения происходят в неостриатуме и представлены грубой атрофией хвостатого ядра и скорлупы, значительная потеря нейронов наблюдается в глубоких слоях коры головного мозга, различная степень атрофии отмечается в других базальных ганглиях (таламусе, бледном шаре, черной субстанции), мозжечке и белом веществе [10].

Несмотря на то, что первое описание БГ было сделано в 1872 г., а мутация, вызывающая заболевание, обнаружена в 1993 г., многочисленные попытки

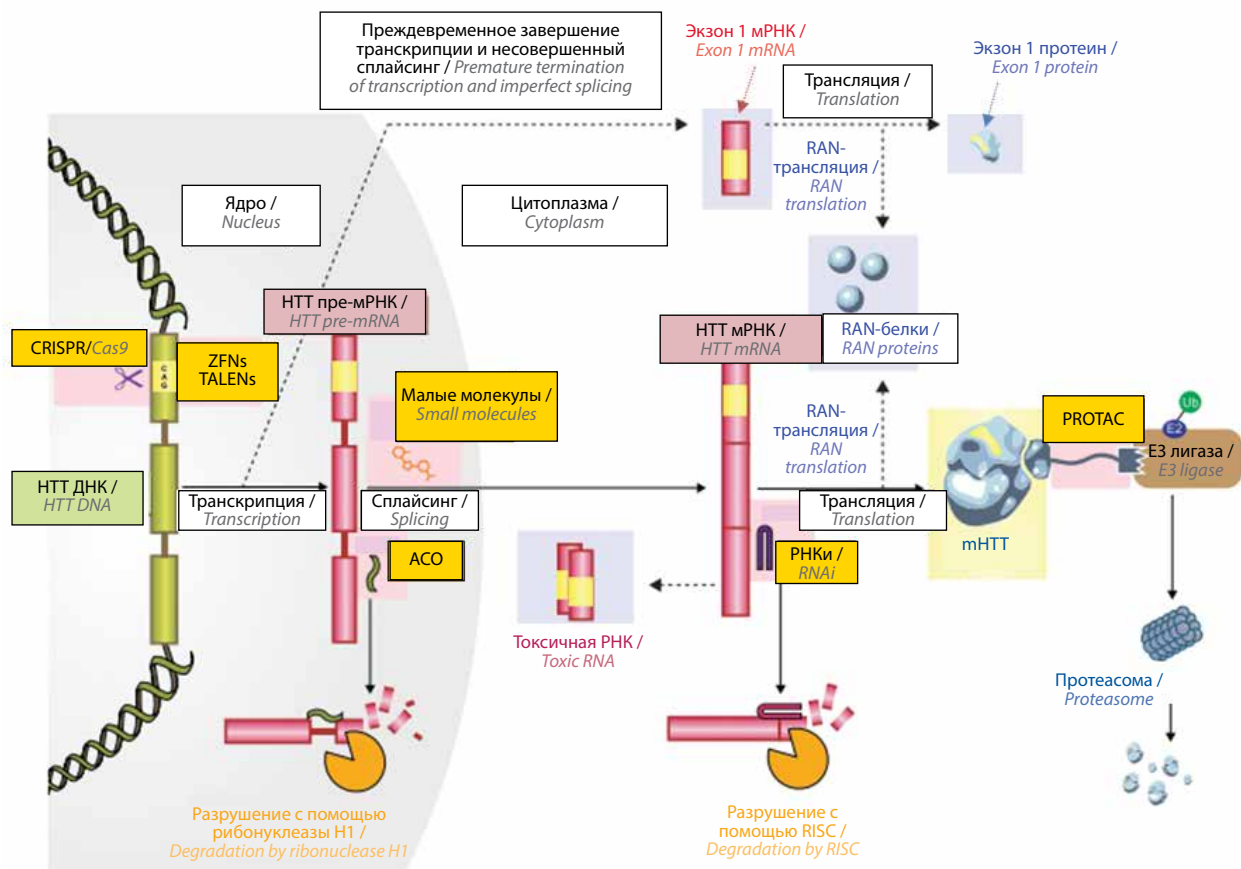
разработки эффективной терапии до настоящего времени не принесли результата. Однако в связи с развитием новых методов генотерапии и улучшением понимания патогенеза БГ появляются новые подходы, которые могут влиять как на саму мутацию, так и на молекулы, синтезируемые с мутантного гена. В этом плане БГ оказывается идеальной болезнью для исследования перспективных способов лечения, поскольку является моногенным заболеванием, имеющим длительный продромальный период, во время которого возможно изменить течение заболевания до возникновения необратимых изменений в головном мозге [8].

На сегодняшний день этиопатогенетическая терапия БГ не разработана. Медикаментозная терапия, направленная на симптоматическую коррекцию двигательных и эмоционально-волевых нарушений, позволяет эффективно контролировать симптомы болезни только в части случаев. Индивидуальный подбор препаратов определяется клинической картиной

у конкретного пациента в зависимости от формы и стадии заболевания. Наиболее выраженный терапевтический эффект показали препараты из группы ингибиторов везикулярного моноаминового транспортера II центрального действия: тетрабеназин и деутетрабеназин, которые могут рассматриваться как препараты выбора для коррекции самой хореи, да и то лишь при отсутствии в клинической картине у пациента тяжелой депрессии, психоза или агрессивного поведения [8, 11].

### Генная и клеточная терапия болезни Гентингтона

В настоящее время в мире ведутся многоцентровые клинические исследования генной терапии у пациентов с БГ. Исследуется широкий спектр потенциальных терапевтических средств как на животных моделях, так и на людях. Разнообразие методов генной терапии обусловлено большим количеством метаболических путей, вовлеченных в патогенез при БГ (см. рис. 1).



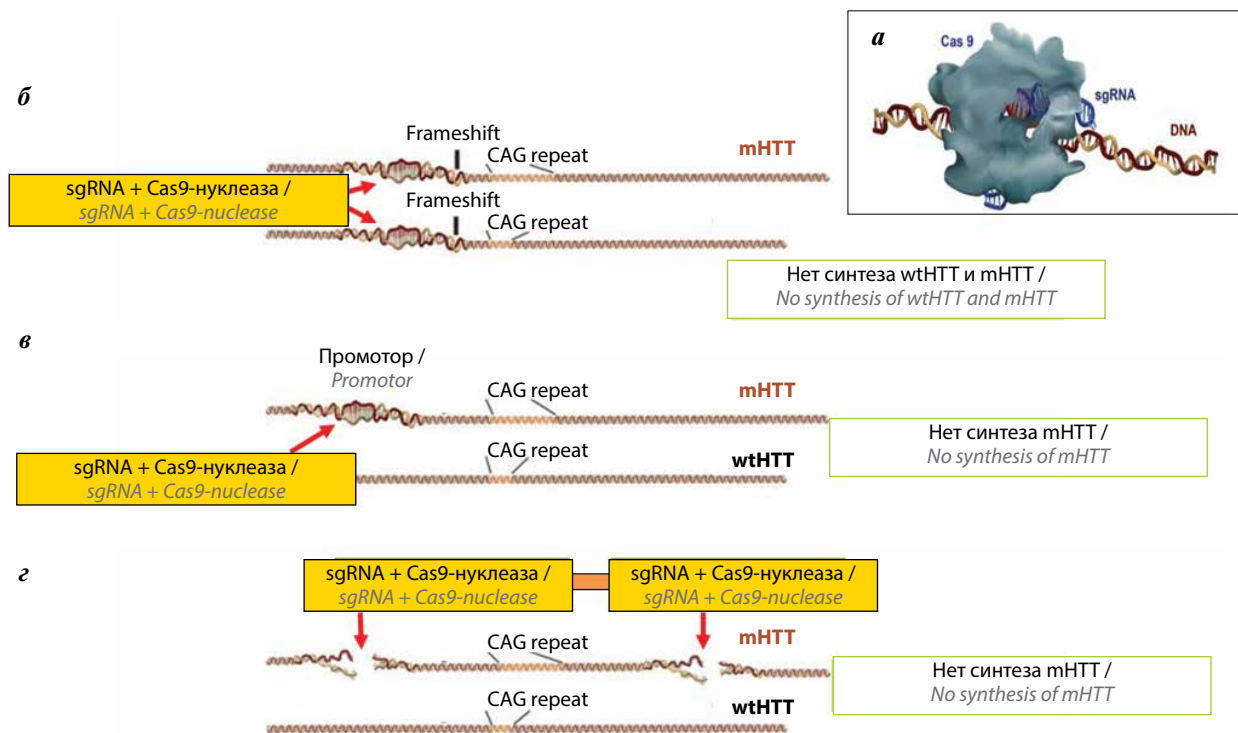
**Рис. 1.** Образование потенциально токсичных молекул при болезни Гентингтона и основные механизмы снижения уровня патологических пре-мРНК, мРНК и mHTT (адаптировано из [6]). mHTT – мутантный гентингтин; ZFNs – нуклеазы, связанные с цинковыми пальцами; TALENs – эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции; ACO – антисмысловые олигонуклеотиды; РНКи – РНК-интерференция; RISC – РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга; PROTAC – химера, нацеленная на протеолиз; RAN translation – повтор, не ассоциированный с AUG-трансляцией

**Fig. 1.** Formation of potentially toxic molecules in Huntington's disease and the main mechanisms for reducing pathological pre-mRNA, mRNA and mHTT (adapted from [6]). mHTT – mutant huntingtin; ZFNs – zinc-finger nucleases; TALENs – transcription activator-like effector nuclease; ACO – ASO, antisense oligonucleotide; RNAi – RNA interference; RISC – RNA-induced silencing complex; PROTAC – proteolysis-targeting chimera; RAN translation – repeat associated non-AUG translation

**Подходы, влияющие на ДНК.** Перспективными методами лечения БГ являются подходы, непосредственно воздействующие на ген *HTT*. Среди них можно выделить 3 основных вида систем редактирования генома: ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9-систему. В структуре каждой такой системы обязательно должны присутствовать 2 компонента: ДНК-связывающий элемент, который направляет всю систему к определенному участку генома и связывается с ним, и эффекторный элемент, представленный нуклеазой – ферментом, разрезающим нить ДНК [6]. Нуклеазы, связанные с цинковыми пальцами (ZFNs), и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALENs), схожи между собой, так как роль ДНК-связывающего элемента выполняют белковые структуры, распознающие увеличенное число CAG-повторов в мутантном аллеле гена *HTT*. При этом важно заметить, что действие нуклеазы, вырезающей нарушенный участок гена *HTT*, не распространяется на нормальный аллель и не приводит к уменьшению количества wtHTT [3, 6]. Кроме того, нельзя допустить выраженного снижения концентрации нормального гентингина в клетках, поскольку он, вероятно, смягчает токсичность патологического белка и увеличивает выживаемость нейронов с помощью синтеза нейротрофического фактора мозга (BDNF) [8].

Немного другое строение имеет CRISPR/Cas9-система, представленная сгруппированными, регулярно чередующимися короткими палиндромными последовательностями и нуклеазами. В данной системе ДНК-связывающим элементом является особая единая направляющая РНК (sgRNA), состоящая из 20 азотистых оснований и обеспечивающая направление и прикрепление всей системы к определенной последовательности ДНК. Cas9-нуклеаза выполняет в этой системе роль эффекторного компонента, разрезающего сразу 2 цепи ДНК [12, 13] (рис. 2, а). После того, как Cas9-нуклеаза вносит двухцепочечный разрыв, происходит восстановление целостности ДНК. Чаще всего можно заметить простое соединение одного конца цепи, содержащей разрыв, с другим концом – негомологичное соединение концов (NHEJ). Однако нередко при таком восстановлении между концами появляются малые инсерции и делеции, что может привести к сдвигу рамки считывания и изменению экспрессии гена.

При неаллельспецифических подходах комплекс sgRNA + Cas9-нуклеаза, как правило, направляют на промотор, находящийся перед 1-м экзоном гена *HTT* (рис. 2, б), причем sgRNA связывается как с мутантным аллелем, так и с нормальным. В области промотора под действием Cas9-нуклеазы происходит двухцепочечный разрыв, который восстанавливается с помощью NHEJ,



**Рис. 2.** Строение CRISPR/Cas9-системы и основные стратегии редактирования мутировавшего гена *HTT* с помощью CRISPR/Cas9-системы (адаптировано из [13]): а – строение CRISPR/Cas9-системы; б – неаллельспецифический подход; в – аллельспецифический подход тип I; z – аллельспецифический подход тип II. mHTT – мутантный гентингтин; wtHTT – гентингтин «дикого типа»; SNP – однонуклеотидный полиморфизм

**Fig. 2.** Structure of the CRISPR/Cas9 system and basic strategies for editing the mutated *HTT* gene using the CRISPR/Cas9 system (adapted from [13]): а – CRISPR/Cas9 system structure; б – non-allele specific approach; в – allele specific approach I; z – allele specific approach II. mHTT – mutant huntingtin, wtHTT – wild huntingtin, SNP – single nucleotide polymorphism

приводящего к спонтанным инсерциям и делециям и сдвигу рамки считывания, что часто ведет к образованию преждевременного стоп-кодона [13]. Далее активируется так называемый нонсенс-опосредованный распад мРНК (NMD), в ходе которого происходит ее деградация в цитоплазме. В результате наблюдается снижение количества не только патологических, но и нормально сформированных мРНК и гентингина [6, 8, 14].

Аллельспецифические стратегии направлены строго на мутантный аллель и возможны благодаря наличию однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs). При аллельспецифическом подходе используется sgRNA, которая одновременно связывается с нужным геном и с SNP, расположенным рядом с этим геном. Такая sgRNA направляется только к мутантному аллелю, не взаимодействуя с нормальным аллелем [13]. Таким образом, найдя SNP в промоторе, можно с легкостью модифицировать представленный выше неаллельспецифический подход в аллельспецифический (рис. 2в).

Также можно использовать 2 sgRNA: одна будет связываться с промотором, другая — с первым интроном, который идет вслед за первым экзоном; при этом важно, чтобы 1 из 2 sgRNA была еще нацелена и на SNP, характерный для мутантного аллеля. В результате происходит вырезание только мутантного первого экзона и остановка синтеза патологического белка [7, 13, 15, 16] (рис. 2, з). Описаны 3 наиболее распространенных SNP, которые позволяют отличать патологический аллель от нормального в гене *HTT*: в экзоне 39 — rs363125, в экзоне 57 — rs362273, в экзоне 6 — rs362307 [17]. Однако такие варианты SNPs встречаются примерно у 75 % пациентов, у остальных (представители азиатских популяций) выявляются менее распространенные SNPs, что значительно ограничивает возможность создания универсального, применимого ко всем пациентам аллельспецифического лекарства [7].

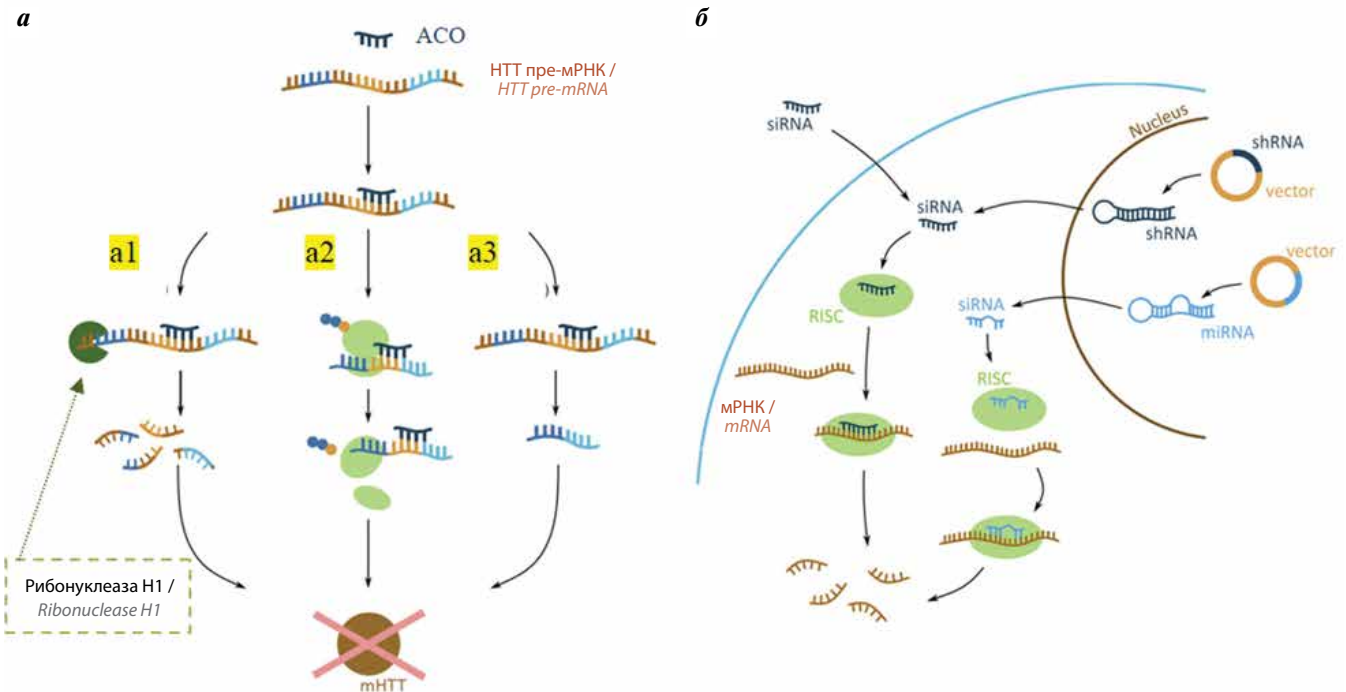
**Подходы, влияющие на РНК.** Стратегии, применяемые на посттранскрипционном уровне, подразделяют на 3 группы: терапия с помощью антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), РНК-интерференция и низкомолекулярные модуляторы сплайсинга [12]. В конечном счете все эти методы запускают усиленную деградацию или трансляционное подавление мутантной мРНК, приводя к уменьшению количества мутантного белка гентингина. В последние годы применение АСО становится все большей реальностью, поскольку было одобрено несколько препаратов, созданных на основе этой технологии, для лечения наследственных заболеваний у человека, а многие другие находятся на различных этапах разработки и клинических испытаний. Основу данного подхода составляют АСО — короткие одноцепочечные молекулы ДНК, состоящие из 15–40 нуклеотидов и связывающиеся в ядре с комплементарными последовательностями пре-мРНК, синтезированными на мутантном аллеле гена *HTT*. Существует несколько возможных вариантов такого

взаимодействия [6, 12]. Чаще всего образовавшийся гибрид пре-мРНК–АСО расщепляется особым ферментом организма — рибонуклеазой H1, которая разрывает фосфодиэфирную связь между нуклеотидами (рис. 3а, а1). Также АСО могут присоединяться к последовательности, содержащей старт-кодон AUG, с которого начинается процесс трансляции, создавая тем самым пространственные препятствия для действия рибосом, что приводит к невозможности синтеза патологического гентингина на матрице мРНК (рис. 3, а, а2). Также АСО могут модулировать сплайсинг, препятствуя встраиванию мутантного 1-го экзона в зрелую мРНК (рис. 3, а, а3).

Сайленсинг, т.е. подавление экспрессии генов, можно осуществить и с помощью методов, базирующихся на РНК-интерференции. В их основе лежит введение в организм двухцепочечных молекул РНК, которые связываются с РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) в цитоплазме. Затем в этом комплексе двойная цепочка разделяется на две, и одна из образовавшихся цепей соединяется с мРНК-мишенью. RISC, обладая эндонуклеазной активностью, расщепляет мРНК-мишень. Такими двухцепочечными молекулами РНК являются малая интерферирующая РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и короткая шпильчатая РНК (shRNA), из которой путем ферментативного преобразования формируется siRNA [6, 12, 14] (рис. 3б). Таким образом, применяя данный подход при БГ, можно добиться снижения уровня патологического белка. В методах, использующих АСО и РНК-интерференцию, так же как и в подходах на основе CRISPR/Cas9-системы, можно выделить неаллель- и аллельспецифические стратегии, основанные на SNPs, отличающих мутантные и нормальные пре-мРНК и мРНК друг от друга [7, 12].

Также для снижения уровня мутантной мРНК применяют низкомолекулярные модуляторы сплайсинга. Результатом их влияния является разрушение мРНК за счет NMD. На роль таких молекул в основном претендуют производные кумарина и мирицетин, которые обладают относительно высокой чувствительностью к CAG-повторам, однако нецелевые эффекты (т.е. взаимодействие с другими пре-мРНК) наблюдаются довольно часто [8, 12, 18]. Большим преимуществом данного подхода перед всеми остальными будет возможность принимать такие препараты перорально, в отличие от других методов, при которых лекарства вводятся в субарахноидальное пространство либо непосредственно в паренхиму мозга.

**Подходы, непосредственно снижающие уровень мутантного гентингина.** В дополнение к терапевтическим подходам, которые снижают уровень mHTT, нацеливаясь либо на ДНК, либо на РНК, существуют технологии снижения содержания гентингина, основанные на увеличении клеточного клиренса белка mHTT. В клетке имеется 2 основные системы, которые способ-



**Рис. 3.** Подходы, уменьшающие количество пре-мРНК и мРНК mHTT (адаптировано из [3]): а – основные виды взаимодействия АСО с пре-мРНК mHTT в ядре клетки (а1 – гибрид пре-мРНК:АСО расщепляется рибонуклеазой Н1; а2 – АСО создают пространственные препятствия для действия рибосом, что тормозит процесс трансляции, а3 – АСО модулируют сплайсинг пре-мРНК mHTT); б – РНК-интерференция: разрушение мРНК mHTT в цитоплазме клетки при помощи малых молекул РНК (siRNA, miRNA, shRNA) и комплекса RISC. mHTT – мутантный гентингтин; АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; siRNA – малая интерферирующая РНК; miRNA – микроРНК; shRNA – короткая РНК, образующая шпильку

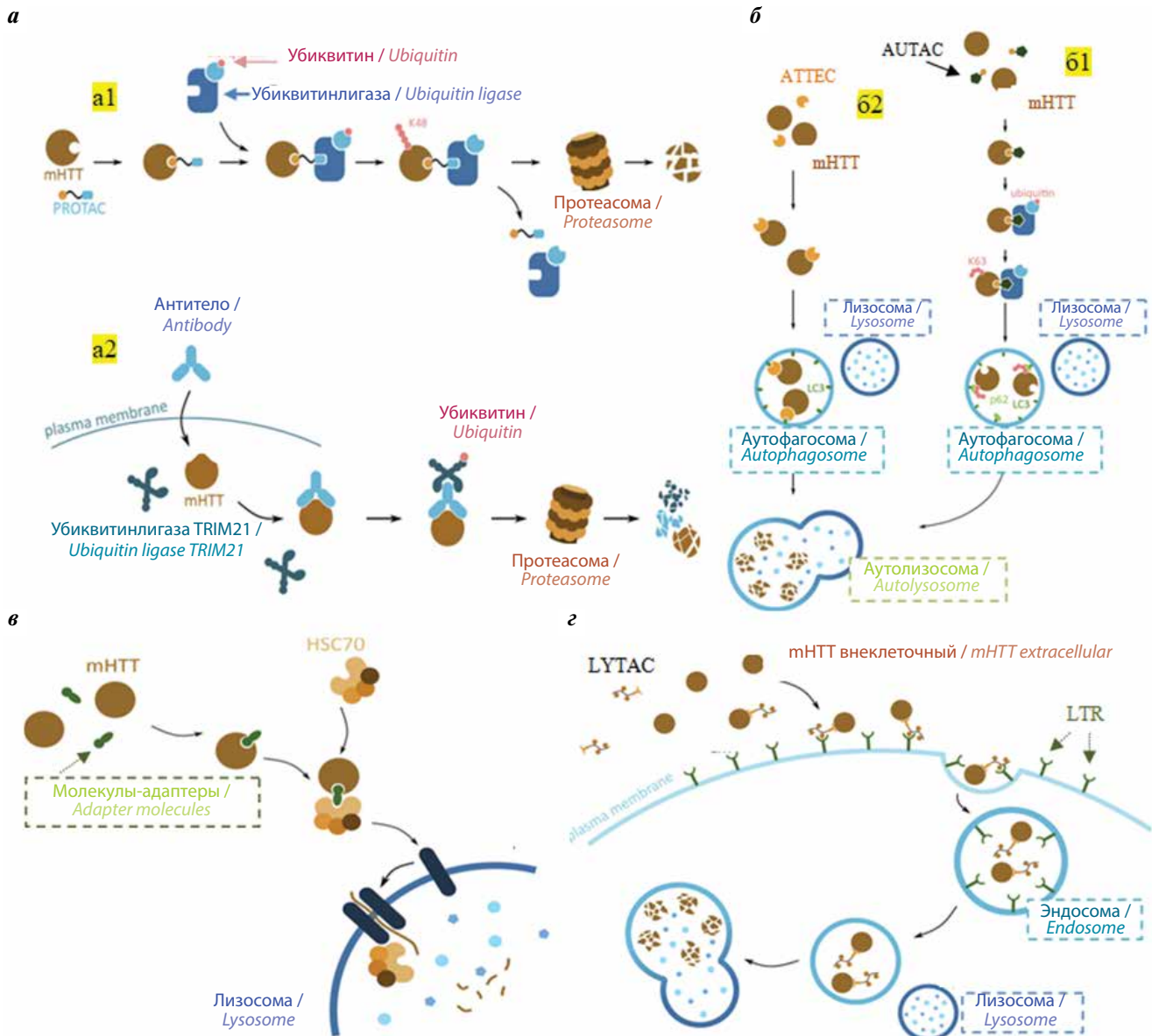
**Fig. 3.** Approaches that reduce mHTT pre-mRNA and mHTT mRNA (adapted from [3]): а – the main types of interaction of ASO with mHTT pre-mRNA in the cell nucleus (a1 – pre-mRNA hybrid: ASO is splitted by ribonuclease H1; a2 – ASO creates spatial obstacles to the action of ribosomes, which inhibits the translation process; a3 – ASO modulates pre-mRNA splicing of mHTT); б – RNA interference: destruction of mRNA of mHTT in the cytoplasm of a cell by small RNA molecules (siRNA, miRNA, shRNA) and RISC. mHTT – mutant huntingtin; ASO – ASO, antisense oligonucleotide; siRNA – small interfering RNA; miRNA – microRNA; shRNA – short hairpin RNA

ствуют распаду дефектных белков, а также их агрегатов: убиквитин-протеасомная система (УПС) и аутофаго-лизосомная система (АЛС). УПС удаляет растворимые и короткоживущие белки, маркируя их убиквитином и нацеливая на протеасому, что приводит к распаду на отдельные аминокислоты, а АЛС разрушает более крупные цитоплазматические структуры, такие как агрегированные белки и поврежденные органеллы, разрушая их в аутофагосомах и перенося в лизосому с образованием аутолизосомы [19]. Для запуска УПС и АЛС к белку-мишени должен присоединиться убиквитин, а процесс убиквитинирования осуществляется с помощью фермента убиквитинлигазы. Следует отметить, что данный фермент может присоединить убиквитин не только к мишени, но и к другой молекуле убиквитина через остаток лизина, создавая полиубиквитиновые цепи. И в зависимости от того, с каким остатком лизина произошло сцепление, а также от размера белка-мишени будет активизироваться либо убиквитин-протеасомная система, либо аутофаго-лизосомная система. Однако эти системы при БГ функционально снижены, поскольку инактивируются самим патологическим гентинггином, что еще больше обуславливает прогрессирование заболевания [7, 19].

Большой интерес представляют способы лечения, непосредственно воздействующие на УПС и АЛС. Самым известным из них является использование молекулы-химеры, нацеленной на протеолиз (PROTAC), которая сближает mHTT и убиквитинлигазу, способствуя тем самым убиквитинированию mHTT и его протеолизу через УПС (рис. 4, а, а1). Учитывая, что в организме человека существует много разновидностей убиквитинлигазы, для снижения системного эффекта PROTAC можно направить на убиквитинлигазы, специфичные для головного мозга, например TRIM9, что является преимуществом данного подхода [19].

Еще одним методом на основе УПС является технология Trim-Away, при которой используется антитело, связывающееся с mHTT, после этого соединение антитело-мишень распознается специальным рецептором антитела, объединенным с убиквитинлигазой TRIM21, происходит аутоубиквитинирование TRIM21 и разрушение протеасомой всего образовавшегося белкового комплекса [3, 19] (рис. 4а, а2).

Также существуют подходы, направленные на АЛС: разработана молекула-химера, нацеленная на аутофагию (AUTAC), которая по аналогии с PROTAC приводит к полиубиквитинированию mHTT (молекулы



**Рис. 4.** Подходы, непосредственно снижающие уровень мНТТ (адаптировано из [3]): а – подходы, действующие через убиквитин-протеасомную систему (а1 – молекула PROTAC сближает мНТТ и убиквитинлигазу, способствуя полиубиквитинированию мНТТ и его протеолизу через УПС; а2 – метод Trim-Away: комплекс антитело-мНТТ связывается с убиквитинлигазой TRIM21, что приводит к аутоубиквитинированию TRIM21 и разрушению протеасомой всего образовавшегося белкового комплекса); б – подходы, действующие через аутофаго-лизосомную систему (б1 – молекула AUTAC сближает мНТТ и убиквитинлигазу, способствуя полиубиквитинированию мНТТ и его протеолизу через АЛС; б2 – молекула ATTEC соединяет мНТТ с мембранным белком аутофагосомы); в – метод СМА, при котором шаперон HSC70 обуславливает перемещение мНТТ в лизосому; з – молекула LYTAC связывает внеклеточный мНТТ с рецептором LTR, что приводит к эндоцитозу и разрушению мНТТ. мНТТ – мутантный гентингтин; УПС – убиквитин-протеасомная система; АЛС – аутофаго-лизосомная система; СМА – шаперон-опосредованная аутофагия

**Fig. 4.** Approaches that directly reduce mHTT (adapted from [3]): а – approaches operating through the ubiquitin-proteasome system (а1 – the PROTAC molecule brings mHTT and ubiquitin ligase closer together, promoting polyubiquitination of mHTT and its proteolysis via the ubiquitin-proteasome system; а2 – Trim-Away method: The antibody-mHTT complex binds to ubiquitin ligase TRIM21, leading to TRIM21 autoubiquitination and proteasome destruction of the entire resulting protein complex); б – approaches through the autophago-lysosomal system (б1 – the AUTAC molecule brings mHTT and ubiquitin ligase closer together, promoting polyubiquitination of mHTT and its proteolysis via ALS; б2 – the ATTEC molecule connects mHTT to the autophagosomal membrane protein); в – the chaperone-mediated autophagy method, in which the chaperone HSC70 causes the movement of mHTT into the lysosome; з – the LYTAC molecule binds extracellular mHTT to the LTR receptor, leading to endocytosis and destruction of mHTT. mHTT – mutant huntingtin; UPS – ubiquitin-proteasome system, ALS – autophago-lysosomal system, CMA – chaperone-mediated autophagy

убиквитина соединяются друг с другом через другие остатки лизина, в отличие от подходов, использующих PROTAC), что ведет к разрушению белка с помощью аутолизосомы (рис. 4б, б1). Близким, но все же отличающимся механизмом обладает соединение, связывающее аутофагосому (АТТЕС), которое соединяет мутантный гентингтин с белком, входящим в состав мембраны аутофагосомы, тем самым помещая агрегаты в полость пузырька [3] (рис. 4б, б2).

Помимо УПС и АЛС в деградации белков участвуют шапероны. Существует шаперон HSC70, который, присоединяясь к белку-мишени, обуславливает его перемещение в лизосому. Это привело к созданию еще одного подхода на основе шаперон-опосредованной аутофагии (СМА), в котором используются специальные молекулы, облегчающие взаимодействие между HSC70 и mHTT [3, 19] (рис. 4, в).

Внедряются подходы, которые влияют не только на внутриклеточно расположенный белок, но и на внеклеточный, что является довольно важным дополнением к терапии, поскольку в настоящее время считается, что mHTT может передаваться от клетки к клетке, подобно прионам, и запускать в соседних здоровых клетках процесс агрегации. Так, используется технология на основе молекулы-химеры, нацеленной на лизосому (ЛТАС), которая связывает внеклеточный гентингтин с рецептором, нацеленным на лизосому (LTR), что приводит к эндоцитозу и дальнейшему разрушению патологического белка при слиянии эндосомы с лизосомой [3] (рис. 4, г).

**Клеточная терапия.** Целью клеточной терапии, основанной на использовании стволовых клеток, при БГ является восстановление поврежденных нервных структур и утраченных функций путем замены погибших нейронов на новые клетки. Учитывая, что при данном заболевании происходит преимущественная дегенерация средних шипиковых нейронов полосатого тела, подходы на основе стволовых клеток ориентированы на восполнение именно этих нейронов [10, 20]. Поскольку в патологический процесс вовлечены другие отделы головного мозга, клеточная терапия неприемлема в качестве единственно применяемой терапии. Проводятся исследования плюрипотентных стволовых клеток, которые могут превращаться в MSNs [10, 20].

**Система восстановления несоответствия ДНК.** В патогенезе экспансии тринуклеотидных повторов при БГ возможную роль играет система восстановления несоответствия ДНК (MMR). Эта система предназначена для распознавания и исправления ошибок во время репликации ДНК и рекомбинации. Благодаря 2 ее гетеродимерам – MutSβ, который состоит из белков MSH3 и MSH2 и распознает необходимый участок нуклеотидной цепочки, и MutLα, представленному белками MLH1 и PMS2 и осуществляющему разрезание ДНК – происходит восстановление нужной последовательности. Однако при БГ после действия комплекса MutLα в ДНК вставляются дополнительные триплеты CAG [6, 21] (рис. 5). Для функционирования MMR-системы необходимо, чтобы 2 этих димера взаимодействовали между

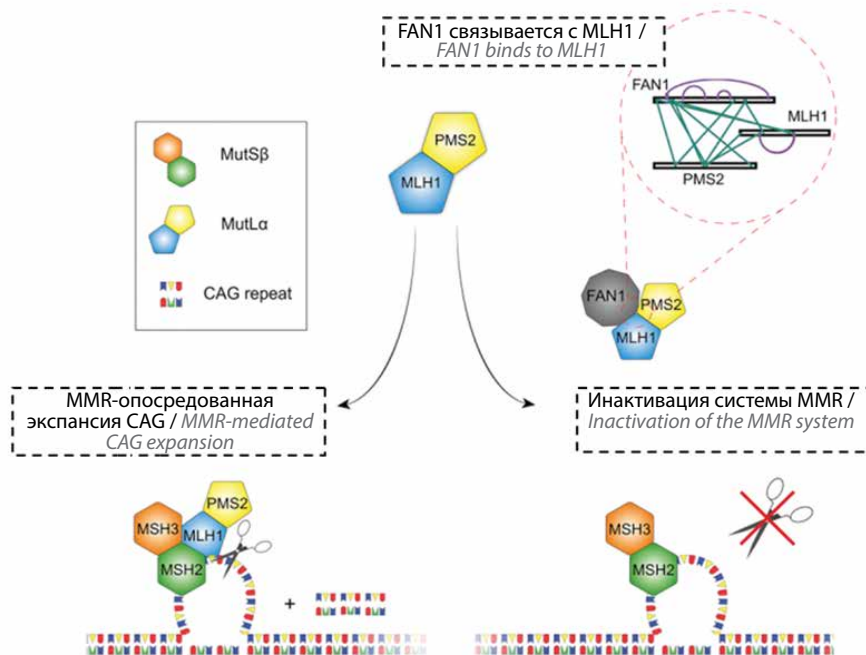


Рис. 5. Роль системы MMR (система восстановления несоответствий ДНК) в патогенезе болезни Гентингтона и взаимодействие фермента FAN1 с компонентами системы MMR (адаптировано из [21])

Fig. 5. The importance of MMR (DNA mismatch repair pathway) in the pathogenesis of Huntington's disease and the interaction of FAN1 with components of MMR (adapted from [21])



собой путем соединения белков MSH3 и MLH1 друг с другом. Но в организме человека существует особый фермент FAN1 (основная его функция – устранять межцепочечные сшивки ДНК), который конкурирует с MSH3 за MLH1. Связываясь с MLH1, FAN1 препятствует его соединению с MSH3 и инактивирует тем самым MMR-систему, что, в свою очередь, предотвращает экспансию CAG-триплета [21] (см. рис. 5). Таким образом, появляется новая мишень в терапии БГ, основанная на увеличении количества FAN1, стимулировании его связи с MLH1 и снижении уровня MSH3 [12, 21, 22].

Еще одним потенциальным подходом в лечении БГ может стать ингибирование депо-управляемых кальциевых каналов (SOC-каналов), а также снижение уровня белка, который их активирует, поскольку при данном заболевании наблюдается гиперактивация кальциевых каналов в нейронах [18].

При БГ также нарушается фосфорилирование некоторых белков нервной системы и самого mHTT, что приводит к его агрегации и извращает ответ нейронов полосатого тела на дофамин и глутамат, что, возможно, вносит свой вклад в симптоматику болезни. Нормализация процессов фосфорилирования и дефосфорилирования может стать еще одним подходом в лечении данного заболевания [23].

### Обсуждение

Таким образом, в нашем обзоре мы попытались осветить новые подходы к этиотропной терапии БГ, направленные как на саму патологическую мутацию, так и на продукты патологического гена (пре-mРНК, зрелую мРНК и особенно mHTT).

Из подходов, влияющих на ДНК и РНК, наиболее перспективными представляются аллельспецифические методы, поскольку они не уменьшают количество неизмененного гентингина, играющего важную роль в нормальном функционировании организма. Минусом аллельспецифических подходов является невозможность создания универсального лекарства для всех пациентов.

В самой группе ДНК-направленных методов, на наш взгляд, предпочтение следует отдать CRISPR/Cas9-системе, поскольку это наиболее развивающаяся система редактирования генома, которая в последнее время подвергается различным модификациям, совершенствующим ее действие. Минусом подходов, влияющих на ДНК, является необратимое изменение генома, что требует от таких методов большой точности и гарантии их безопасности.

В группе РНК-направленных методов предпочтение следует отдать АСО, поскольку они уже испытываются на пациентах и имеют большее количество разнообразных механизмов действия, в отличие от других стратегий из данной группы, что делает возможным выбор оптимального механизма при создании лекарства. Также подходы, влияющие на РНК, требуют повторного

периодического введения, что, с одной стороны, создает неудобство в их применении, но с другой – позволяет вовремя прекратить терапию при появлении нежелательных лекарственных реакций.

В группе подходов, непосредственно снижающих уровень мутантного гентингина, предпочтение следует отдать методам, основанным на применении молекул-химер (PROTAC, AUTAC, LYTAC), поскольку с помощью химер можно связать 2 определенные молекулы, предотвращая неспецифическое действие лекарственного средства.

Также перспективен подход, основанный на использовании фермента FAN1, поскольку инактивирует систему MMR, предположительно участвующую в патогенезе заболевания.

Разработка новых методов лечения дает возможность начать терапию БГ на более ранних стадиях до развития тяжелых клинических проявлений, тем самым улучшая прогноз течения заболевания. Совершенствование доклинической диагностики позволяет лучше понять особенности манифестации определенных симптомов и варианты течения заболевания у пациентов с БГ. Диагностика продромального периода БГ, в свою очередь, имеет большое значение для начала патогенетической терапии, поскольку более 50 % клеток стриатума уже погибают на момент клинического диагноза. Ранней постановке диагноза способствуют генетическое тестирование лиц с положительным семейным анамнезом, оценка ранних двигательных, когнитивных и психических расстройств, методы структурной и функциональной нейровизуализации, такие как магнитно-резонансная томография и позитронно-эмиссионная томография головного мозга, измерение биомаркеров заболевания в спинномозговой жидкости (mHTT, NF-L-белок (легкий белок нейрофиламентов), таубелок) [6, 24, 25].

В то же время установление диагноза у пресимптоматических пациентов поднимает множество этических вопросов. Особенно это актуально в тех случаях, при которых манифестация заболевания начинается не с двигательных, а с поведенческих нарушений. Поэтому ранняя диагностика, в том числе основанная на результатах молекулярно-генетического исследования, должна опираться на следующие этические принципы: информированность о заболевании, добровольность, автономность личности, справедливость и конфиденциальность. Право знать (автономия) и, в качестве альтернативы, не знать должно оцениваться по этическим принципам «не причинять вреда» и «обязанность заботиться» (благодетельность). Большое значение имеют степень осведомленности человека о признаках заболевания и готовность принять диагноз. Кроме того, следует учитывать, что в большинстве случаев человек ищет не клинический диагноз, а уверенность в том, что у него нет признаков заболевания. И в качестве альтернативы: отсрочка постановки диагноза уважает

право не знать, исключает потенциальную дискриминацию и позволяет человеку жить «нормальной» жизнью дольше, в контексте болезни без лечения [2, 26].

Еще более сложными нам представляются этические вопросы, связанные с проведением генотерапии. Вероятно, самой оптимальной стадией для начала терапии является продромальная стадия, поскольку на животных моделях показано, что изменения в мозге начинаются уже на эмбриональной стадии, а метаболические признаки и начальные дегенеративные изменения в мозге возникают за десятилетие до начала клинических симптомов [25].

Кроме того, остается ряд вопросов, требующих дальнейшего решения: относительная эффективность различных подходов, важность специфического нацеливания на мНТТ, оптимальное распределение лекарств (в мозге и на периферии), а также спектр побочных эффектов.

### Заключение

На протяжении последнего десятилетия заметное развитие получили методы генотерапии ряда заболеваний с поражением центральной нервной системы, в том

числе БГ, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера. БГ является одной из самых удачных моделей нейродегенеративного заболевания для разработки и тестирования новых терапевтических подходов, основанных на результатах фундаментальных исследований.

Разработка новых методов терапии обосновывает необходимость ранней диагностики пресимптоматической и продромальной стадии БГ, особенно в семьях,отягощенных по заболеванию. Основные этические принципы, используемые при пресимптоматической диагностике и планировании лечения БГ, включают информированность о заболевании, добровольность, автономность личности, справедливость и конфиденциальность.

По нашему мнению, наиболее перспективными подходами к этиотропной терапии БГ являются ряд ДНК- (CRISPR/Cas9-система) и РНК-направленных методов (АСО, РНК-интерференция), методы, непосредственно снижающие уровень мутантного гентингина (молекулы-химеры), а также подходы, основанные на инактивировании системы восстановления несоответствия ДНК с использованием фермента FAN1.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bakels H.S., Roos R.A.C., van Roon-Mom W.M.C. et al. Juvenile-onset huntington disease pathophysiology and neurodevelopment: a review. *Mov Disord* 2022;37(1):16–24. DOI: 10.1002/mds.28823
- Клюшников С.А. Болезнь Гентингтона. Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна 2020;1(3):139–58. DOI: 10.17816/2686-8997-2020-1-3-139-158
- Klyushnikov S.A. Huntington's disease. *Mevrologicheskii zhurnal im. L.O. Badalyana = L.O. Badalyan Neurological Journal* 2020;1(3):139–58. (In Russ.). DOI: 10.17816/2686-8997-2020-1-3-139-158
- Jarosińska O.D., Rüdiger S.G.D. Molecular strategies to target protein aggregation in Huntington's disease. *Front Mol Biosci* 2021;8:769184. DOI: 10.3389/fmolb.2021.769184
- Sharon I., Sharon R., Wilkens J.P. et al. Huntington disease dementia. Available at: [https://emedicine.medscape.com/article/289706overview?reg=1&icd=login\\_success\\_email\\_match\\_norm#a6](https://emedicine.medscape.com/article/289706overview?reg=1&icd=login_success_email_match_norm#a6).
- Caron N.S., Wright G.E.B., Hayden M.R. Huntington disease. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1305/>.
- Tabrizi S.J., Ghosh R., Leavitt B.R. Huntingtin lowering strategies for disease modification in Huntington's disease. *Neuron* 2019;101(5):801–19. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.01.039
- Fields E., Vaughan E., Tripu D. et al. Gene targeting techniques for Huntington's disease. *Ageing Res Rev* 2021;70:101385. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101385
- Shannon K.M. Recent Advances in the treatment of Huntington's disease: targeting DNA and RNA. *CNS Drugs* 2020;34(3):219–28. DOI: 10.1007/s40263-019-00695-3
- Świtońska-Kurkowska K., Krist B., Delimata J. et al. Juvenile Huntington's disease and other PolyQ diseases, update on neurodevelopmental character and comparative bioinformatic review of transcriptomic and proteomic data. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:642773. DOI: 10.3389/fcell.2021.642773
- Beatriz M., Lopes C., Ribeiro A.C.S. et al. Revisiting cell and gene therapies in Huntington's disease. *J Neurosci Res* 2021;99(7):1744–62. DOI: 10.1002/jnr.24845
- Kumar A., Kumar V., Singh K. et al. Therapeutic advances for Huntington's disease. *Brain Sci* 2020;10(1):43. DOI: 10.3390/brainsci10010043
- Frank W., Lindenberg K.S., Mühlhäck A. et al. Krankheitsmodifizierende Therapieansätze bei der Huntington-Krankheit: Blicke zurück und Blicke voraus [Disease-modifying treatment approaches in Huntington disease : Past and future]. *Nervenarzt* 2022;93(2):179–90. DOI: 10.1007/s00115-021-01224-8
- Vachey G., Déglon N. CRISPR/Cas9-Mediated genome editing for Huntington's disease. *Methods Mol Biol* 2018;1780:463–81. DOI: 10.1007/978-1-4939-7825-0\_21
- Marxreiter F., Stemick J., Kohl Z. Huntington lowering strategies. *Int J Mol Sci* 2020;21(6):2146. DOI: 10.3390/ijms21062146
- Dabrowska M., Juzwa W., Krzyzosiak W.J. et al. Precise excision of the CAG tract from the Huntingtin gene by Cas9 nickases. *Front Neurosci* 2018;12:75. DOI: 10.3389/fnins.2018.00075
- Kolli N., Lu M., Maiti P. et al. CRISPR-Cas9 mediated gene-silencing of the mutant huntingtin gene in an *in vitro* model of Huntington's disease. *Int J Mol Sci* 2017;18(4):754. DOI: 10.3390/ijms18040754
- Pfister E.L., Kennington L., Straubhaar J. et al. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol* 2009;19(9):774–8. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.030
- Vigot V.A., Grekhnev D.A., Lebedeva O.S. et al. STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of Huntington's disease. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:625231. DOI: 10.3389/fcell.2021.625231
- Harding R.J., Tong Y.F. Proteostasis in Huntington's disease: disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39(5):754–69. DOI: 10.1038/aps.2018.11
- Monk R., Connor B. Cell Replacement therapy for Huntington's disease. *Adv Exp Med Biol* 2020;1266:57–69. DOI: 10.1007/978-981-15-4370-8\_5

21. Goold R., Hamilton J., Menneteau T. et al. FAN1 controls mismatch repair complex assembly via MLH1 retention to stabilize CAG repeat expansion in Huntington's disease. *Cell Rep* 2021;36(9):109649. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109649
22. Wheeler V.C., Dion V. Modifiers of CAG/CTG repeat instability: insights from mammalian models. *J Huntingtons Dis* 2021;10(1):123–48. DOI: 10.3233/JHD-200426
23. Fjodorova M., Louessard M., Li Z. et al. CTIP2-regulated reduction in PKA-dependent DARPP32 phosphorylation in human medium spiny neurons: implications for Huntington disease. *Stem Cell Rep* 2019;13(3):448–57. DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.07.015
24. Paulsen J.S. Early detection of Huntington disease. *Future Neurol* 2010;5(1):10.2217/fnl.09.78. DOI: 10.2217/fnl.09.78
25. Иллариошкин С.Н. Болезнь Гентингтона как модель для изучения нейродегенеративных заболеваний. *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений* 2016;(1):3–11. Illarionov S.N. Huntington's disease as a model for the study of neurodegenerative diseases. *Byulleten Nacionalnogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstroystv dvizheniy = National Society for the Study of Parkinson's Disease and Movement Disorders Bulletin* 2016;(1):3–11. (In Russ.)
26. Akrich M., Paterson F., Rabeharisoa V. Social and ethical issues regarding presymptomatic diagnosis: a literature review. Available at: <https://hal-mines-paristech.archives-ouvertes.fr/hal-03040870/document>.

#### Вклад авторов

О.Б. Кондакова, С.В. Демьянов: концепция и дизайн исследования, написание и редактирование статьи;  
 А.В. Красивская, Е.Р. Радкевич, Г.В. Демьянов: концепция и дизайн исследования, написание статьи;  
 Ю.И. Давыдова, Д.И. Гребенкин, А.А. Лялина: написание статьи, оформление демонстрационных материалов.  
 К.В. Савостьянов: написание и редактирование статьи.

#### Authors' contributions

O.B. Kondakova, S.V. Demyanov: concept and design of the study, writing and editing the article;  
 A.V. Krasivskaya, E.R. Radkevich, G.V. Demyanov: concept and design of the study, writing the text;  
 Yu.I. Davydova, D.I. Grebenkin, A.A. Lyalina: writing the article, design of demonstrating materials;  
 K.V. Savostyanov: writing and editing the article.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

О.Б. Кондакова / O.B. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0002-6316-9992>  
 С.В. Демьянов / S.V. Demyanov: <https://orcid.org/0000-0002-1893-7198>  
 А.В. Красивская / A.V. Krasivskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9971-8909>  
 Е.Р. Радкевич / E.R. Radkevich: <https://orcid.org/0000-0003-0206-0114>  
 Г.В. Демьянов / G.V. Demyanov: <https://orcid.org/0000-0003-1584-4604>  
 А.А. Лялина / A.A. Lyalina: <https://orcid.org/0000-0001-5657-7851>  
 Ю.И. Давыдова / Yu.I. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5978-854X>  
 Д.И. Гребенкин / D.I. Grebenkin: <https://orcid.org/0000-0002-0551-5869>  
 К.В. Савостьянов / K.V. Savostyanov: <https://orcid.org/0000-0003-4885-4171>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Funding.** The work was performed without external funding.

**Статья поступила:** 13.01.2023. **Принята к публикации:** 21.02.2023.

**Article submitted:** 13.01.2023. **Accepted for publication:** 21.02.2023.