

GENSKO ZDRAVLJENJE HUNTINGTONOVE BOLEZNI

GENE THERAPY FOR HUNTINGTON'S DISEASE

AVTOR / AUTHOR:

Damjan Avsec
Ines Flegar

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
damjan.avsec@hotmail.com

1 UVOD

Huntingtonova bolezen je redka neozdravljiva neurodegenerativna dedna bolezen, ki prizadene 5 do 10 ljudi na 100.000. Deduje se avtosomno dominantno in se začne izražati pri ljudeh med 30. in 50. letom starosti. Za značilno simptomatiko je zadolžena mutacija v genu za protein huntingtin (*HTT*), ki se nahaja na kromosomskem lokusu 4p16.3. Zaradi ekspanzije ponovitev trojčka nukleotidov CAG na 5'-koncu *HTT* nastaja mutiran *HTT* (m*HTT*), ki tvori inkluzijska telesa in povzroča okvare nevronov v striatumu (1).

POVZETEK

Huntingtonova bolezen je redka neozdravljiva neurodegenerativna bolezen centralnega živčevja, ki jo povzroča mutacija v genu za huntingtin (*HTT*). Trenutno nimamo zdravila, ki bi ozdravilo ali upočasnilo potek bolezni, zato je zdravljenje večinoma simptomatsko. Gensko zdravljenje predstavlja nov pristop, ki cilja vzrok za nastanek te bolezni. Preučujejo vnos nevroprotektivnih genov ter tehnologije utišanja genov in urejanja genoma v upanju, da bodo ti pristopi upočasnili napredovanje bolezni. Članek se osredotoča na principe teh novih pristopov in podaja trenutno stanje razvoja genskega zdravljenja pri Huntingtonovi bolezni.

KLJUČNE BESEDE:

CRISPR/Cas9, Huntingtonova bolezen, gensko zdravljenje, proteini z domeno cinkovega prsta, protismiselni oligonukleotid, RNA-interferenca

ABSTRACT

Huntington's disease is a rare, incurable neurodegenerative disease of the central nervous system caused by the mutation in the *HTT* gene. Currently, there is no treatment that can cure or slow the course of Huntington's disease, so the treatment is aimed at ameliorating symptoms. Gene therapy is a promising new approach that targets the cause of Huntington's disease. Insertion of neuroprotective genes, gene silencing, and genome editing technologies are being investigated in the hope of proving effective in stopping progression of the disease. The article focuses on principles of this new approaches and presents the current state of development of gene therapy for Huntington's disease.

KEY WORDS:

antisense oligonucleotide, CRISPR/Cas9, gene therapy, Huntington's disease, RNA interference, zinc finger proteins

Zdravljenje Huntingtonove bolezni poteka simptomatsko, pri čemer uporabljamo antipsihotike, antidepresive in te-trabenazin, ki je namenjen zdravljenju horeje (2). Ker je HD za razliko od drugih neurodegenerativnih bolezni monogenska bolezen, se v zadnjih letih kot nova možnost zdravljenja ponuja gensko zdravljenje.

2 KAJ JE GENSKO ZDRAVLJENJE?

Pri genskem zdravljenju gre v osnovi za vnos terapevtskega gena v organizem z uporabo primerne vektorja. Ta je lahko virusni ali nevirusni, pri čemer so na primeru Huntingtonove bolezni najbolj proučevali adenoasociacijske virusne (AAV) vektorje. AAV je nepatogen virus z nizko imunogenostjo, ki za okužbo celic in razmnoževanje potrebuje pomoč adenovirusa. Sposoben se je počasi, a z večjo specifičnostjo, vgraditi na kromosomski lokus 19q13.4, kar omogoča dolgotrajno izražanje terapevtskega gena (3).

Glavna ovira genskega zdravljenja Huntingtonove bolezni je težavna dostava terapevtskih genov v možgane. Kot možnosti za dostavo se ponujajo intratekalna in intraventrikularna injekcija, vnos s pomočjo črpalke in uporaba virusnih vektorjev, ki ciljajo možgane (3). Kot možni dostavni sistem lahko omenimo še vsaditev enkapsuliranih celic z vstavljenim terapevtskim genom (4).

3 VNOS NEVROPROTEKTIVNIH GENOV

Večina terapevtskih genov, vnesenih s pomočjo AAV, deluje nevroprotektivno in tako zmanjša simptome bolezni. Dokazali so, da je v možganih bolnikov s Huntingtonovo boleznijo pomanjkanje možganskega nevrotrofičnega dejavnika (BDNF), kar je najverjetneje posledica transkripcijske disregulacije in zmanjšane aksonskega transporta. Zato vnos gena za BDNF, ki omogoča preživetje, rast in plastičnost nevronov striatuma, predstavlja eno od možnosti za zmanjšanje degeneracije striatalnih nevronov in upočasnitev napredovanja bolezni (3, 5). Podobno nevroprotektivno vlogo imata še gena za nevrotrofični dejavnik celic glije (GDNF) in neurturin; slednji pri intrastriatalni dostavi deluje zaščitno tudi na kortikalne nevrone, katerih spremembe se pri HD kažejo v kognitivnih in psihičnih motnjah (3).

Med nevrotrofičnimi dejavniki je po raziskavah na celičnih linijah in živalskih modelih največji obet predstavljal ciliarni nevrotrofični dejavnik (CNTF), ki spada med citokine in vodi diferenciacijo celic v astrocite. Bil je prvi trofični dejav-

nik, ki je vstopil v fazo I kliničnega testiranja. CNTF so vgradili v ledvične celice mladiča hrčka (BHK), ki so jih nato enkapsulirali in vstavili v desni lateralni ventrikel. Rezultati klinične raziskave niso bili dovolj dobri, da bi nadaljevali s testiranjem, so pa dokazali prednost takšnega dostavnega sistema pred sistemsko aplikacijo (4).

Najverjetneje so razlog za manjšo učinkovitost nevrotrofičnih dejavnikov pri simptomatskih pacientih s Huntingtonovo boleznijo toksični učinki mHTT, ki po dosegu določene koncentracije mHTT v nevronih postanejo ireverzibilni (3).

4 UTIŠANJE GENOV

Za razliko od drugih nevrodegenerativnih bolezni pri Huntingtonovi bolezni dobro poznamo vzrok, zato lahko s pristopi, ki zavrejo izražanje mHTT na transkripcijskem ali posttranskripcijskem nivoju, upočasnimo ali preprečimo nastop bolezni (5). Med bolj obetavnimi so naslednji pristopi.

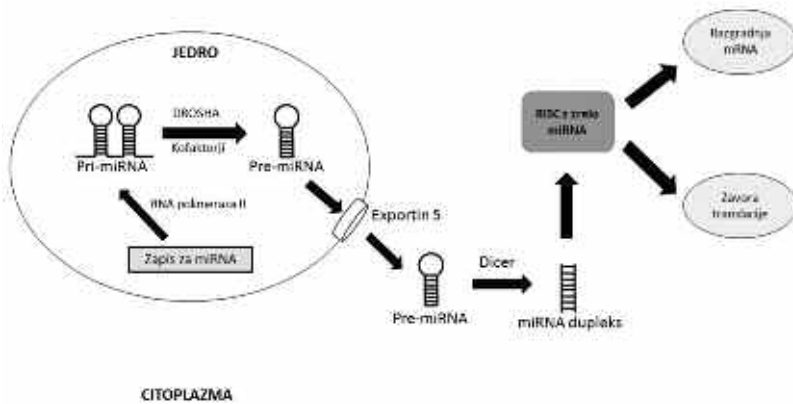
4.1 RNA-INTERFERENCA

RNA-interferenca (RNAi) je evolucijsko ohranjen mehanizem uravnavanja izražanja genov na posttranskripcijskem nivoju. Ko se določen gen prepíše, nastane informacijska RNA (mRNA), ki se prevede v proteinsko zaporedje. Količino mRNA v celicah uravnavajo endogene mikro RNA (miRNA), ki odvisno od stopnje komplementarnosti bodisi fizično zavirajo translacijo bodisi inducirajo razgradnjo mRNA v z RNA-induciranim kompleksu za utišanje genov (RISC) (6).

Po prepisu gena za mikro RNA se sprva tvori primarna miRNA (pri-miRNA), ki zaradi komplementarnosti znotraj transkripta tvori strukturo lasnice. V jedru pod vplivom encima DROSHA in kofaktorjev nastane manjša prekurzorska miRNA (pre-miRNA), ki se preko exportina-5 prenese v citoplazmo. Tam encim DICER prereže lasnico in nastane duplex miRNA. Praviloma je le ena od verig kompleksa miRNA funkcionalna (drugo razgradijo nukleaze) in na osnovi komplementarnosti v kompleksu RISC prepozna in veže tarčne mRNA, kar povzroči njihovo razgradnjo ali (pogosteje) ustavi translacijo (slika 1) (6).

Terapevtska RNA-interferenca deluje na posttranskripcijskem nivoju in zmanjša nastajanje mHTT. Ta pristop vključuje kratke molekule RNA: kratko interferenčno RNA





Slika 1: Biogeneza miRNA in njena funkcija.
Figure 1: Biogenesis and function of miRNA.

(siRNA), kratko lasnično RNA (shRNA) in miRNA (3). V splošnem gre za izkoriščanje endogenega sistema za procesiranje miRNA, s katerim aktiviramo terapevtsko RNAi.

Terapevtske molekule RNAi lahko dobimo z *in vitro* sintezo dvoverižne RNA, kot je to značilno za siRNA, in z ektopičnim izražanjem shRNA ali miRNA v celicah po vnosu ustreznih genov z virusnimi ali plazmidnimi vektorji (6). Sintezo ustvarjena siRNA je v osnovi enaka zrelemu dupleksu miRNA in se lahko po vstopu v celice takoj vgradi v kompleks RISC, medtem ko se morata shRNA in miRNA najprej prepisati iz vnesene DNA, nato pa še predelati v istem sistemu kot endogena miRNA. Za vnos shRNA ali miRNA je uporaben vektor AAV, medtem ko lahko siRNA vnesemo z liposomi. Z vektorjem AAV vnesena shRNA izkazuje dolgotrajnejši učinek. Pri sintezni molekuli siRNA največjo oviro predstavlja težaven vstop v celice in hitro odstranjevanje. Vendar pa lahko sintezne siRNA kemijsko modificiramo, jih konjugiramo s holesterolom in tako izboljšamo celični privzem in njihovo stabilnost (6, 7). Poleg tega je lahko časovno omejeno delovanje siRNA prednost, saj je možno spreminjanje ali prenehanje z zdravljenjem (7).

Čeprav RNAi predstavlja velik potencial za zdravljenje Huntingtonove bolezni, je prav nepoznavanje vseh molekularnih poti, v katere se vpletajo vnesene inhibitorne RNA, razlog za previdnost. Vemo, da je za preprečitev nastopa Huntingtonove bolezni potrebna konstantna zavora translacije mRNA, ki nosi zapis za mHTT. To lahko dosežemo z vektorjem AAV, ki transgen integrira v genom, vendar pa se moramo zavedati, da vnesenega transgena kasneje ne moremo odstraniti. Zagotoviti je treba čim večjo komplementarnost inhibitorne RNA s tarčno mRNA, da zmanjšamo možnosti nespecifičnih učinkov (tj. vezavo na druge

tarče (*off-target effects*)) in drugih učinkov, ki so posledica vmešavanja v endogeni sistem miRNA (6).

Ker je največ bolnikov s Huntingtonovo boleznijo prav heterozigotov, je treba premisliti, ali je smiselno zavirati obe alelni različici, saj so ugotovili, da pogojno izbitje gena za divji tip huntingtina povzroči nevrodegeneracijo (5). Za doseganje specifičnosti terapevta je izkoriščanje povečanja ponovitev CAG malo verjetno. Pri specifičnem ciljanju je treba poiskati polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP), ki so značilni le za mutirano različico *HTT* in se pojavljajo v kodirajočih segmentih gena, kar je zamudno in drago, poleg tega pa je strategija uporabe siRNA ali miRNA, ki ne razlikujejo med aleli *HTT* (t. i. pristop alelni nespecifične RNAi), bolj proučevana (6, 8). Obenem obstajajo študije, ki na modelih Huntingtonove bolezni pri uporabi alelni nespecifične RNAi kažejo izboljšanje vedenja, kljub znižanju divjega tipa huntingtina (9). Prve inhibitorne molekule RNA v kliničnih raziskavah bodo zato najverjetneje nespecifične (6). Z uporabo siRNA bi sicer lahko dosegli visoko selektivnost, vendar je vprašanje, ali bi našli dovolj SNP z dovolj veliko razširjenostjo pri bolnikih s Huntingtonovo boleznijo, da bi bil terapevtik uporaben za večino bolnikov. Verjetno bi bilo potrebno ustvariti nabor alelni specifičnih siRNA, iz katerega bi nato na osnovi genotipizacije bolnika izbrali zanj najbolj ustrezno različico siRNA (8).

4.2 PROTISMISELNI OLIGONUKLEOTIDI

Protismiselni oligonukleotidi (ASO) so v povprečju 20 nukleotidov dolge molekule, ki se prav tako kot siRNA vežejo na komplementarno zaporedje na mRNA *HTT*, kar fizično zavira translacijo mRNA v huntingtin in inducira razgradnjo mRNA z RNazo H (10, 11). Za razliko od RNAi, protismiselni oligonukleotidi za aktivacijo ne potrebujejo endogenega si-

stema za procesiranje miRNA. Za oligonukleotidna zaporedja je značilno, da so občutljiva na razgradnjo z eksonukleazami, zato pri načrtovanju protismiselnih oligonukleotidov pogosto spremenimo fosfodiestrsko vez v fosforotioatno, modificiramo heterocikle purinskih ali pirimidinskih baz in sladkorno-fosfatno verigo (11).

Protismiselne oligonukleotide lahko načrtujemo tako, da dosežemo alelna specifičnost. Za izvedbo tega poiščemo heterozigotne SNP, ki so pogosti in prisotni v mutirani različici gena in njegovem transkriptu pri širokem naboru bolnikov s Huntingtonovo boleznijo. Če je bolnik za izbran SNP homozigot, potem s protismiselnimi oligonukleotidom, načrtovanim za ta SNP, ne moremo doseči specifičnosti. Tehnologija protismiselnih oligonukleotidov ima to prednost pred RNAi, da lahko specifičnost dosežemo tudi z uporabo SNP v intronih, saj se protismiselni oligonukleotidi vežejo tudi na pre-mRNA, kar inducira njeno razgradnjo z RNazo H (12).

Protismiselni oligonukleotidi izkazujejo velik potencial na področju nevrodegenerativnih bolezni, vendar jih je prav tako kot terapevtike na osnovi RNAi potrebno dostaviti z intratekalno ali intrastriatalno injekcijo (10). Trenutno je IONIS-HTRRx, alelna nespecifični kemijsko modificiran protismiselni oligonukleotid, v fazi I/II kliničnega testiranja (13, 14).

4.3 PROTEINI Z DOMENAMI CINKOVIH PRSTOV

Kot zanimiv način zniževanja izražanja mHTT se ponujajo proteini z domenami cinkovih prstov, ki jih lahko načrtujemo tako, da prepoznavajo različna zaporedja v DNA. Od prej omenjenih terapevtskih strategij z RNAi in protismiselnimi oligonukleotidi se razlikujejo v tem, da delujejo na transkripcijskem nivoju in tako ponujajo drugačen pristop k utišanju *mHTT*.

Na mišjem modelu HD R6/2 so dokazali, da proteini z domenami cinkovih prstov, ki se vežejo na ponovitve CAG, izkazujejo določeno selektivnost za *HTT* z večjim številom ponovitev trojčkov nukleotidov CAG. Z nadaljnjimi poskusi so ugotovili, da se proteini z domenami cinkovih prstov ne vežejo na druge gene, ki vsebujejo relativno visoko število ponovitev CAG (15). Proteini z domenami cinkovih prstov tako predstavljajo možnost za zdravljenje Huntingtonove bolezni, vendar so trenutno raziskave v tej smeri na predkliničnem nivoju. Tako kot pri terapevtski shRNA in miRNA bi bilo tudi za proteine z domenami cinkovih prstov potrebno vgraditi gensko informacijo v obliko vektorja AAV, kon-

čni produkt pa dostaviti v možgane z uporabo intrastriatalne injekcije.

5 UREJANJE GENOMA

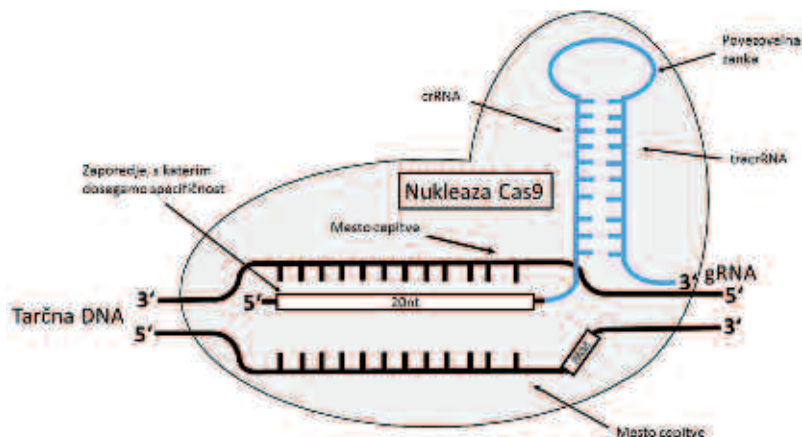
Urejanje genoma ima največji terapevtski potencial pri nekaterih rakavih boleznih in monogenih boleznih, kot je to Huntingtonova bolezen. Za razliko od tehnologij utišanja genov lahko z uporabo naprednih in prefinjenih tehnologij, kot sta nukleaze z motivi cinkovih prstov (ZFN) in CRISPR/Cas9, dosežemo izrez gena, kar trajno zavre njegovo izražanje. Poleg tega lahko na mesto prereza vstavimo nov gen, vendar za zdravljenje Huntingtonove bolezni bolj proučujejo izrez mutiranega *HTT*, ki ga z večjo specifičnostjo omogoča tehnologija CRISPR/Cas9.

5.1 CRISPR/CAS9

CRISPR/Cas je imunski sistem bakterij, ki skrbi za obrambo pred tujimi nukleinskimi kisljinami, kot so virusni genomi. CRISPR so skupki urejeno porazdeljenih kratkih palindromskih zaporedij v bakterijskem genomu, kamor se po vdoru vgradi tuja nukleinska kisljina, ki se nato prepíše in predela v CRISPR RNA (crRNA). CrRNA skupaj s trans-aktivirajočo crRNA (tracrRNA) tvori kompleks s CRISPR-povezanimi (Cas) proteini, kar predstavlja aktiven sistem. Ko enaka tuja nukleinska kisljina ponovno vdre v bakterijsko celico, se tvori heterodupleks DNA-RNA, kar vodi v razgradnjo tuje DNA s sistemom CRISPR/Cas. Eksperimentalno so ugotovili, da lahko ta trikomponentni sistem poenostavimo z združitvijo tracrRNA in crRNA v vodilno RNA (gRNA), znotraj katere približno 20 nukleotidov dolgo zaporedje določa specifičnost (slika 2). Za najbolj uporabno se je med nukleazami Cas izkazala Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes*, ki za delovanje potrebuje zaporedje 5'-NGG-3' (t.i. PAM) neposredno za tarčnim mestom (16).

Z uporabo sistema CRISPR/Cas9, ki prereže znotraj izbranega gena, lahko specifično in trajno zavremo izražanje mHTT, kar predstavlja prednost pred protismiselnimi oligonukleotidi in siRNA. Ker ima takšen pristop za posledico trajno prekinitve transkripcije gena, je treba zagotoviti visoko alelna specifičnost za mutiran *HTT*, kar lahko dosežemo z izbiro tistih heterozigotnih SNP, ki se nahajajo v območju PAM. Za cepitev s Cas9 se mora za tarčnim zaporedjem nahajati zaporedje PAM 5'-NGG-3', kar pomeni, da mo-





Slika 2: Urejanje genoma s tehnologijo CRISPR/Cas9.

Figure 2: Genome editing using CRISPR/Cas9 technology.

ramo v mutiranem alelu imeti NGG, v normalnem pa takšen trojček nukleotidov, ki ne vsebuje gvaninskega nukleotida na drugem ali tretjem mestu (17). Takšen način doseganja specifičnosti se je na celičnih linijah izkazal za uspešnega, vendar je malo verjetno, da bi z izbranimi SNP zajeli celotno populacijo bolnikov s Huntingtonovo boleznijo.

Čeprav za vnos sistema CRISPR/Cas9 v celice največkrat uporabljamo plazmide, takšen sistem ni primeren za vnos *in vivo*. Najboljši vektorji za *in vivo* vnos genov so virusni vektorji, med katerimi je terapevtsko najbolj uporaben vektor AAV. Slabost takega vektorja je predvsem omejena količina genskega materiala, ki ga lahko vanj vgradimo. Nukleaza Cas9 bakterije *S. pyogenes* ima približno 4,2 kb veliko cDNA, vektor AAV pa ima kapaciteto, manjšo od 4,8 kb, poleg tega moramo v isti vektor vgraditi še zaporedje za gRNA. Možna je zamenjava Cas9 z manjšim ortologom, kot je npr. Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus*, ali pa uporaba drugih virusnih vektorjev z večjo kapaciteto, ki pa so terapevtsko manj primerni (16).

Tehnologija CRISPR/Cas9 bo pri Huntingtonovi bolezni med vsemi omenjenimi tehnologijami predstavljala najbolj celovito in trajno rešitev, a morda ne najbolj varno. Zato bo pred uporabo na človeku treba narediti obsežne predklinične raziskave, ki bodo opredelile primernost nadaljevanja v klinično testiranje.

6 PERSONALIZIRANA GENSKA TERAPIJA

Z napredkom na področju genskega zdravljenja se pogosto omenja personalizacija genskega zdravljenja. Ljudje se

med seboj razlikujemo v SNP. Pri uporabi terapevtikov, ki se z visoko specifičnostjo vežejo na tarčna nukleotidna zaporedja, se tako lahko zgodi, da izbran terapevtik za nekoga ni najbolj optimalen. Pri CRISPR/Cas9, ki dosega alelna specifičnost z uporabo SNP v PAM, lahko že en drugačen nukleotid v zaporedju PAM pomeni neučinkovitost ali neselektivnost (17). Poleg tega so tudi terapevtiki na osnovi utišanja genov (RNAi, ASO), ki selektivnost dosegajo z upoštevanjem pogostih SNP, pri manjšini bolnikov neuporabni.

Za posameznika s Huntingtonovo boleznijo bi bilo potrebno izvesti genotipizacijo, da ugotovimo, kateri izmed terapevtikov bi bil zanj najbolj primeren, vendar pričakovati, da bi za vsakega posameznika izdelali poseben terapevtik, ni realno. Vsako zdravilo mora skozi draga klinična testiranja, poleg tega pa so navadno prav genska zdravila tista, ki imajo najmanjšo ciljno populacijo.

7 SKLEPI

Genska terapija glede na dosedanje simptomatsko zdravljenje predstavlja revolucionaren pristop k zdravljenju Huntingtonove bolezni, saj se prvič ponuja možnost preprečitve nastanka bolezni. Kljub velikemu napredku na tem področju je na pot genskega zdravljenja potrebno stopati počasi. Prvič imamo v rokah orodja, s katerimi lahko poljubno preurejamo genom, ob čemer se pojavljajo številna etična vprašanja, ki jih ne smemo zanemariti. Poleg tega zadnje čase prednosti, ki jih ponujajo napredni načini zdravljenja,

v ozadje potiskajo spoznanja, da ne poznamo vseh molekularnih mehanizmov, v katere se s takšnimi pristopi vpletamo. Zato je ključnega pomena, da pred uporabo genškega zdravljenja na bolnikih s Huntingtonovo boleznijo preteče dovolj časa, da poleg učinkovitosti dobro ovrednotimo tudi vidik varnosti.

8 LITERATURA

1. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 40.
2. Videnovic A. Treatment of Huntington Disease. *Curr Treat Options Neurol* 2013; 15(4): 424-438.
3. Ramaswamy S, Kordower JH. Gene therapy for Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 243-254.
4. Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 968-975.
5. Wild EJ, Tabrizi SJ. Targets for future clinical trials in Huntington's disease: What's in the pipeline? *Mov Disord* 2014; 29: 1434-1445.
6. Harper SQ. Progress and challenges in RNA interference therapy for Huntington disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 933-938.
7. DiFiglia M, SenaEsteves M, Chase K et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17204-17209.
8. Lombardi MS, Jaspers L, Spronkmans C et al. A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference. *Exp Neurol* 2009; 217(2): 312-319.
9. Boudreau RL, McBride JL, Martins I et al. Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 2009; 17(6): 1053-1063.
10. Burgunder JM. Orphan drugs in development for Huntington's disease: challenges and progress. *Orphan Drugs Res Rev* 2015; 5: 1-9.
11. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 259-293.
12. Skotte NH, Southwell AL, Ostergaard ME et al. Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *PLoS One* 2014; 9(9): e107434.
13. Glorioso JC, Cohen JB, Carlisle DL et al. Moving toward a gene therapy for Huntington's disease. *Gene Therapy* 2015; 22(12): 931-933.
14. *ClinicalTrials.gov*. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of IONIS-HTRRx in Patients With Early Manifest Huntington's Disease. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02519036>. Dostop: 30-10-2016.
15. GarrigaCanut M, Agustín-Pavón C, Herrmann F et al. Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: E3136-E3145.
16. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther* 2016; 24(3): 430-446.
17. Shin JW, Kim KH, Chao MJ et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw286>. Dostop: 30-10-2016.

