

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова Российской академии наук

На правах рукописи

НЕКРАСОВ Евгений Дмитриевич

**Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных
стволовых клеток человека**

Специальность 03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., проф. Сергей Львович Киселев

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Репрограммирование ядра соматической клетки.....	8
1.2. Генетическое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния	9
1.3. Возможности дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны ..	11
1.4. Использование генетического репрограммирования для изучения и лечения нейродегенеративных заболеваний	12
1.5. Болезнь Альцгеймера.....	14
1.6. Шизофрения.....	15
1.7. Боковой амиотрофический склероз.....	16
1.8. Болезнь Паркинсона.....	17
1.9. Болезнь Гентингтона.....	18
1.10. Перспективы моделирования болезни Гентингтона с помощью ИПСК	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Клеточный материал	22
2.2. Культивирование фибробластов.....	22
2.3. Получение культуры фибробластов из биоптатов кожи человека.....	22
2.4. Замораживание и оттаивание клеток	23
2.5. Культивирование ЭСК и ИПСК человека в бесфидерных условиях.....	23
2.6. Культивирование ЭСК и ИПСК человека на фидере	23
2.7. Приготовление фидера	23
2.8. Покрытие желатином культуральной посуды.....	24
2.9. Сборка лентивирусов	24
2.10. Инфекция клеток лентивирусными векторами	25
2.11. Определение титра лентивирусов.....	25
2.12. Получение ИПСК	25
2.13. Окраска антителами клеточных культур	26
2.14. Агарозный гель-электрофорез нуклеиновых кислот	27
2.15. Выделение хромосомной ДНК	27
2.16. Выделение плазмидной ДНК	27
2.17. Выделение тотальной РНК из клеточных культур	28
2.18. Реакция обратной транскрипции	28

2.19. Полимеразная цепная реакция	28
2.20. Приготовление препаратов метафазных хромосом ЭСК и ИПСК человека.....	30
2.21. GTG-дифференциальное окрашивание	31
2.22. Формирование эмбрионидных телец	31
2.23. Культивирование эмбрионидных телец	31
2.24. Спонтанная дифференцировка ЭСК и ИПСК	31
2.25. Тест на формирование тератом.....	32
2.26. Дифференцировка ПСК человека в срединные шипиковые нейроны стриатума	32
2.27. Культивирование нейрональных предшественников	33
2.28. Электронная микроскопия	33
2.29. Fuga-2 кальциевый имэджинг	34
2.30. Электрофизиологические исследования	34
2.31. Проточная цитометрия клеток, окрашенных Lysotracker	35
2.32. Химические вещества для количественных экспериментов.....	35
2.33. Количественный анализ формы клеточных ядер.....	36
2.34. Количественный анализ гибели клеток	36
2.35. ВЭЖХ анализ секреции ГАМК.....	37
2.36. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор	37
2.37. Секвенирование фрагментов ДНК по Сэнгеру	37
2.38. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов	37
2.39. Статистический анализ	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1. Оптимизация генетического репрограммирования соматических клеток человека.....	39
3.2. Получение фибробластов кожи от пациентов с хореей Гентингтона с малым количеством избыточных повторов в мутантном аллеле гена <i>хантингтина</i>	41
3.3. Проведение генетического репрограммирования фибробластов кожи пациентов с болезнью Гентингтона	42
3.4. Молекулярная характеристика ИПСК	44
3.5. Функциональная характеристика ИПСК	46
3.6. Характеристика набора клеточных линий для моделирования болезни Гентингтона	47
3.7. Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека в клетки, имеющие характеристики срединных шипиковых нейронов стриатума	48

3.8. Проявления болезни Гентингтона в мутантных срединных шипиковых нейронах стриатума, дифференцированных из ИПСК человека <i>in vitro</i>	53
3.9. Количественный анализ содержания лизосом в нормальных и патологических нейронах	55
3.10. Количественный анализ деформации ядерной оболочки внутрь клеточного ядра (инвагинация) в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и контрольной группы	56
3.11. Исследование природы инвагинаций ядерной оболочки	58
3.12. Транскриптомный анализ дифференцированных <i>in vitro</i> нейронов человека, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и контрольных ПСК	60
3.13. Депо-управляемый вход кальция в нормальных и патологических нейронах	63
3.14. Изучение действия потенциального лекарства от болезни Гентингтона EVR4593 на фенотипические проявления болезни в нейронах, дифференцированных из ИПСК	67
3.15. Моделирование старения нейронов	68
3.16. Изучение действия потенциальных лекарств от болезни Гентингтона на модели стареющих нейронов	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
ВЫВОДЫ	76
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	77
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ	78
БЛАГОДАРНОСТИ	81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	82

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания представляют большую группу различных нарушений, которые связаны с постепенной деградацией и гибелью определенных типов нейронов. Болезнь Гентингтона – неизлечимое наследственное нейродегенеративное заболевание. Распространенность болезни Гентингтона колеблется от 0.1-0.38 (Япония, страны Африки) до 3-7 (страны Западной и Восточной Европы, США, Канада) на 100000 человек населения, в некоторых популяциях доходя до 15-17 и выше на 100000 человек населения (остров Тасмания, Венесуэла). Клинические проявления заболевания обычно развиваются в 35-44 года. Средний возраст смерти составляет 54-55 лет. Клиническая картина болезни Гентингтона складывается из сочетания двигательных, эмоционально-волевых и когнитивных расстройств, неуклонно прогрессирующих, и неизбежно заканчивается полным распадом личности и обездвиженностью больных. Нейроморфологическая картина характеризуется прогрессирующей гибелью срединных шипиковых нейронов стриатума. В 1993 году был идентифицирован ген *HTT*, аномальная экспансия тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых повторов в котором является причиной болезни Гентингтона [1]. Нормальные аллели гена *HTT* содержат 10-35 повторов, когда число повторов 36 и более, развивается болезнь. У больных типичными клинически проявляющимися формами хореи Гентингтона число CAG-триплетов составляет 40 и более, в редких случаях может превышать 100 и более. До сих пор не известно каким образом мутация в гене *HTT* приводит к гибели нейронов. На сегодняшний день современные лекарственные препараты лишь облегчают часть симптомов [2–4], предоставляя ограниченную помощь пациентам. К тому же, их постоянное использование часто приводит к серьезным побочным эффектам. Выяснение причин нейродегенерации и поиск новых лекарств невозможны без создания моделей заболеваний. Ограниченный доступ исследователей к нервным клеткам человека привел к разработке многочисленных моделей на животных и на клетках различной природы, которые создаются и используются исследователями в течение последних десятилетий. Такие модельные организмы как *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и *Danio rerio* были полезны в выявлении и исследовании механизмов различных нейродегенеративных заболеваний, включая хорею Гентингтона, а также для скрининга соединений, предназначенных для коррекции выявленных нарушений [5–7]. Тем не менее, гораздо более простые нервные системы и филогенетическое расстояние этих видов от человека ограничивает их использование в качестве трансляционных моделей. Самые популярные из моделей на животных для изучения возрастных нейродегенеративных заболеваний человека – это модели на основе трансгенных мышей [8]. Такие модели незаменимы при изучении ранней стадии болезни, патофизиологических механизмов, а также

для отработки методов клеточной терапии и трансплантации. Тем не менее, необходимо понимать, что даже современные генно-инженерные модели на мышах лишь частично воспроизводят сложные клинические особенности человеческих заболеваний.

Разработанная в 2006 году технология генетического репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния позволяет из легкодоступных соматических клеток взрослого организма, таких как, например, фибробласты кожи, получить в лабораторных условиях индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые по своим свойствам аналогичны эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК). Так же, как ЭСК, ИПСК могут неограниченно расти в культуре и дифференцироваться в любые типы клеток организма. За разработку технологий репрограммирования в 2012 году была присуждена Нобелевская премия Джону Гордону и Шинья Яманака. Технология получения ИПСК открыла целое новое направление в моделировании заболеваний человека. Благодаря возможности получения ИПСК от любого пациента в совокупности с возможностью их дифференцировки практически в любой клеточный тип, модели заболеваний на основе ИПСК могут быть созданы для любой, даже самой редкой болезни. Особый интерес представляют нейродегенеративные заболевания из-за ограниченного доступа исследователей к нейронам человека. Исследования способов моделирования нейродегенеративных заболеваний с помощью ИПСК, в том числе и болезни Гентингтона, активно проводятся во всем мире. Однако большинство различий между нормальными и патологическими нейронами из ИПСК человека получены на линиях ИПСК с большим количеством CAG повторов (60 и более), что соответствует ювенильной форме хореи Гентингтона, которая может принципиально отличаться от классической формы болезни Гентингтона по молекулярным механизмам.

До сих пор остается нерешенным целый ряд вопросов как фундаментального, так и прикладного характера: как получать обогащенные культуры нейронов стриатума из ИПСК человека, насколько такие нейроны соответствуют нейронам мозга человека, какие фенотипические отличия существуют между здоровыми и больными нейронами человека и как эти отличия количественно оценивать?

Настоящая диссертационная работа посвящена актуальным вопросам моделирования классической формы болезни Гентингтона с использованием ИПСК человека, а именно, получению и характеристике ИПСК человека от пациентов с болезнью Гентингтона, дифференцировке ИПСК человека в клетки, подобные срединным шипиковым нейронам стриатума и их характеристике, а также фенотипическим различиям между нейронами от пациентов с болезнью Гентингтона и от здоровых людей.

Целью данной работы являлось изучение молекулярно-генетических механизмов болезни Гентингтона на основе нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных

стволовых клеток человека с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* с целью поиска средств терапии.

Задачи работы:

1. Провести генетическое репрограммирование соматических клеток пациентов с болезнью Гентингтона с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* с целью создания модели заболевания *in vitro*.
2. Охарактеризовать линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от носителей болезни Гентингтона и контрольной группы.
3. Разработать воспроизводимый протокол эффективной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума, которые наиболее подвержены нейродегенерации *in vivo* при болезни Гентингтона.
4. Провести сравнительный анализ срединных шипиковых нейронов стриатума, полученных от носителей болезни Гентингтона и контрольной группы.
5. Изучить возможность использования разработанной модельной системы для поиска новых лекарственных средств, предотвращающих процесс нейродегенерации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нейроны, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, имеют морфологическое и молекулярно-генетическое сходство с срединными шипиковыми нейронами стриатума человека.
2. На основе дифференцированных из ИПСК пациент-специфичных нейронов с мутацией в гене *HTT* разработана воспроизводимая модельная система, отражающая основные нейродегенеративные процессы болезни Гентингтона, происходящие *in vivo* и *in vitro*.
3. На дифференцированных *in vitro* пациент-специфичных срединных шипиковых нейронах стриатума впервые показано действие потенциального лекарственного средства, предотвращающего нейродегенерацию при болезни Гентингтона с малым количеством избыточных CAG-повторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Репрограммирование ядра соматической клетки

В начале шестидесятых годов XX века существовали различные гипотезы о том, каким образом оплодотворенная яйцеклетка в процессе эмбрионального развития может произвести клетки взрослого организма более чем 200 различных специализированных типов. Было очевидно, что половые клетки сохраняют полный набор генов, но вопрос о сохранении генов в соматических клетках не был столь однозначным. Одна из доминирующих гипотез предполагала, что избыточные гены теряются или необратимо инактивируются, когда клетка становится специализированной [9]. Так, например, предполагали, что нейроны теряют гены, ответственные за формирование легкого или, например, производство пищеварительных ферментов. Альтернативная гипотеза заключалась в том, что соматические клетки сохраняют полный набор генов, а за специализацию клеток отвечает их избирательная экспрессия. В 1962 году Джон Гордон, вдохновленный работами Бриггса и Кинга [10], показал, что ядро соматической клетки шпорцевой лягушки можно репрограммировать, то есть заставить вести себя, как ядро оплодотворенной яйцеклетки. Для этого он переносил ядра эпителиальных клеток кишечника в энуклеированные ооциты шпорцевой лягушки, которые впоследствии могли развиваться в здоровых головастиков [11]. Эти эксперименты показали, что геном, по крайней мере, некоторых соматических клеток может быть переведен в тотипотентное состояние, а в цитоплазме яйцеклетки лягушки присутствуют факторы, которые способны это сделать. Эта работа была удостоена Нобелевской премии в 2012 году. В 1996 году был совершен технологический прорыв: Кэмпбелл и соавторы в Эдинбурге получили двух ягнят методом переноса ядра из клеток дифференцированной клеточной линии, полученной из девятидневных эмбрионов овец [12]. Год спустя эта же технология была успешно использована для клонирования взрослой овцы, в качестве клеток-доноров ядер использовали взрослые клетки молочной железы [13]. Рождение овечки Долли доказало, что клоны млекопитающих могут быть получены из ядер клеток взрослых млекопитающих. Дальнейшие исследования в области клонирования млекопитающих позволили в 2013 году методом переноса ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит получить ЭСК человека [14].

1.2. Генетическое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния

В 1981 году двумя группами исследователей было показано, что клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты мыши способны длительное время пролиферировать *in vitro*, оставаясь при этом плюрипотентными, то есть, способными к дифференцировке во все ткани организма, исключая трофобласт [15,16]. Такие клетки назвали эмбриональными стволовыми клетками. ЭСК человека были впервые получены в 1998 году Томсоном и коллегами из избыточных бластоцист, невостребованных в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий [17]. Важным свойством ЭСК мыши является то, что, несмотря на длительное существование в культуре *in vitro*, они могут полностью выполнить программу эмбрионального и онтогенетического развития при помещении их обратно в бластоцисту. В химерной мыши производные ЭСК могут присутствовать во всех тканях, включая клетки зародышевого пути. Таким образом, с ЭСК мыши можно проводить генетические манипуляции *in vitro*, а затем получать гетерозиготных или гомозиготных мутантных мышей [18,19]. За открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток, то есть за изобретение метода нокаута генов, в 2007 году М. Эвансу, О. Смитису и М. Капеччи была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Развитие технологий полногеномного анализа позволило достаточно точно охарактеризовать транскрипционный профиль генов, экспрессирующихся в различных специализированных клетках, в том числе и в ЭСК. Целый ряд транскрипционных факторов оказался уникальным для плюрипотентного состояния и, скорее всего, они определяли это состояние. Экспериментально это было доказано Такахаши и Яманака, которые клонировали выбранные гены в ретровирусные векторы и инфицировали ими в различных комбинациях мышинные фибробласты. Были идентифицированы 4 гена транскрипционных факторов: Oct-4, Sox2, c-Myc и Klf4, которые переводят фибробласты в плюрипотентное состояние. Клетки, полученные таким образом, назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Результаты этой работы были опубликованы в 2006 году [20], экспериментальный подход поразил многих ученых, работающих в данной области как совершенно неожиданный, хотя предпосылки к успеху были еще в 1987 году – Дэвис и соавторы показали, что трансгенная экспрессия единственного транскрипционного фактора MyoD может превратить фибробласты в клетки мышц [21]. Получение ИПСК не требует разрушения эмбрионов, что снимает этические проблемы, связанные с применением таких плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) в научных исследованиях и, в будущем, в регенеративной медицине. Уже через год после

оригинальной публикации, в 2007 году, Яманака успешно получил ИПСК из фибробластов человека с использованием того же набора транскрипционных факторов OCT4, SOX2, c-Myc и KLF4 [22]. Независимой группой Джеймса Томсона в том же году были получены ИПСК человека с использованием иного набора генов: OCT4, SOX2, NANOG и LIN28 [23]. Дальнейшие исследования продемонстрировали возможность получения ИПСК от различных видов млекопитающих: крыс [24], макак-резусов [25], свиней [26], используя различные типы соматических клеток для проведения генетического репрограммирования: кератиноцитов [27], нейрональных клеток [28], клеток печени и клеток желудка [29], терминально дифференцированных лимфоцитов [30]. В Российской Федерации были впервые получены ИПСК из эндотелия [31]. Эти исследования продемонстрировали универсальность процесса генетического репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния с помощью введения в клетки генов транскрипционных факторов. Целый ряд подходов был разработан для того чтобы доставлять репрограммирующие факторы в соматические клетки. В первых работах по получению и характеристике ИПСК использовались преимущественно ретровирусные векторы [32], которые встраиваются в геном клетки-хозяина. Было показано, что ретровирусные трансгены перестают экспрессироваться к концу репрограммирования [33], это явление назвали замолканием трансгена, или сайленсингом. Группе Яманака впервые удалось генетически репрограммировать соматические клетки до плюрипотентного состояния с помощью плазмид, не интегрирующих в геном клетки-хозяина, однако эффективность такого репрограммирования оказалась крайне низкой [34]. Были также продемонстрированы и другие методы генетического репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния без интеграции экзогенной ДНК в геном клетки-хозяина: с использованием piggyBac транспозона [35], синтетической РНК [36], аденовирусных векторов [37], вируса Сендай [38], эписомных векторов [39], белков [40]. Так как генетическое репрограммирование – это, в общем, низкоэффективный процесс (обычно менее 0.1% соматических клеток могут быть репрограммированы), были проведены работы по поиску способов повышения эффективности генетического репрограммирования. Были идентифицированы химические молекулы, которые повышают эффективность генетического репрограммирования [41–43]. Эти молекулы, как правило, оказывают влияние на эпигенетическое состояние клетки и/или способны выполнять функцию некоторых репрограммирующих факторов. Дальнейшее развитие этого подхода позволило в 2013 году репрограммировать мышинные фибробласты до плюрипотентного состояния с использованием одних только малых химических молекул [44]. В работе Ханна и коллег было показано, что при ингибировании белка MBD3, который принимает участие в ремоделировании хроматина, клетки мышцы могут быть репрограммированы почти со 100% эффективностью [45]. Функционально ИПСК и ЭСК полностью эквивалентны друг другу

[46,47], однако полногеномные исследования транскрипционного и эпигеномного (модификации гистонов, метилирование ДНК, реактивация X хромосомы) профилей этих ПСК показали в некоторых случаях наличие различий. Генетические и эпигенетические отличия между ЭСК и ИПСК могут влиять на процесс дифференцировки, что может привести при дифференцировке к появлению клеток с профилями экспрессии генов и биологическими характеристиками, отличными от клеток, полученных из ЭСК [46]. Тесты на способность к дифференцировке считают ключевыми в доказательстве плюрипотентности клеток. Для ИПСК мыши в качестве основного теста на способность к дифференцировке обычно используется тест на формирование жизнеспособных химер [46]. Методом инъекции диплоидных ИПСК в тетраплоидную бластоцисту (тетраплоидная комплементация) была выращена мышь, организм которой полностью развился из ИПСК, что указывает на эквивалентность некоторых линий ИПСК по своей способности к дифференцировке эмбриональным стволовым клеткам [47]. В случае клеток человека исследователям доступны только менее строгие тесты, такие как *in vitro* дифференцировки, формирование тератом при введении иммунодефицитным мышам и способность к образованию эмбрионидных телец. Способность к формированию тератом является необходимым и достаточным тестом для того, чтобы определять клетки человека как плюрипотентные [46,48].

1.3. Возможности дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) обладают естественным свойством дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма, но важнейшей экспериментальной и биотехнологической задачей является осуществление дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro* в нужном направлении с использованием специальных условий культивирования, биологически активных химических соединений и белковых факторов. За последние годы удалось достичь значительных успехов в дифференцировке ПСК человека в специализированные типы человеческих нейронов. Так, например Жанг и коллеги дифференцировали ЭСК человека в нейрональном направлении, получая культуры нейронов, состоящие на 80% из срединных шипиковых нейронов стриатума [49]. Крикс и соавторы сообщили о получении в результате дифференцировки из ЭСК и ИПСК человека культуры нейронов, 80% которых экспрессировали маркеры дофаминергических нейронов TH, FOXA2 и LMX1A [50]. Аморосо и коллеги с использованием Hb9-GFP репортера разработали протокол дифференцировки ПСК в культуры нейронов, состоящих на 50% из мотонейронов идентифицированных по маркерам HB9 и ISL [51]. Также из ИПСК и ЭСК успешно были получены пирамидальные нейроны человека, которые демонстрировали существенные черты

аутентичных пирамидальных нейронов, включая профили генной экспрессии, морфологию и электрофизиологию [52].

1.4. Использование генетического репрограммирования для изучения и лечения нейродегенеративных заболеваний

Технология генетического репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния открыла возможность из легкодоступных клеток, таких как, например, фибробласты кожи, получить в лабораторных условиях ИПСК человека, которые, в свою очередь, можно неограниченно наращивать в культуре. Достижения в области направленной дифференцировки ПСК человека, в свою очередь, позволяют получать нейроны определенных типов с достаточно высокой эффективностью (рис. 1). Началом применения этих технологий для моделирования заболеваний человека можно считать работу Парка и соавторов [53], в которой было впервые сообщено об успешном получении и характеристике ИПСК от пациентов с различными наследственными заболеваниями: болезнью Гоше третьего типа, мышечной дистрофией Дюшенна и Беккера, болезнью Паркинсона, болезнью Гентингтона в ювенильной форме, сахарным диабетом 1 типа, синдромом Дауна, синдромом Лёша – Найхана и других. Особый интерес сразу же привлекли заболевания нервной системы, так как для большинства болезней нервной системы эффективные методы терапии пока еще не разработаны, патологический процесс, как правило, мало изучен и имеет крайне сложный механизм, отсутствуют адекватные модельные системы для изучения патогенеза этих заболеваний, а доступ исследователей к нейронам человека, особенно в случае редких заболеваний, сильно ограничен.

Нейродегенеративные заболевания – это группа наследственных или приобретенных заболеваний нервной системы. Общим для нейродегенеративных заболеваний является, как правило, медленно прогрессирующая гибель определенных групп нейронов, ведущая к различным неврологическим симптомам. Среди нейродегенеративных заболеваний выделяют целый ряд подгрупп: таупатии (характерно чрезмерное фосфорилирование тау-белка, например болезнь Альцгеймера), синуклеопатии (характерно накопление в клетках мозга α -синуклеина, например болезнь Паркинсона), тринуклеотидные заболевания (наследственные заболевания, характеризующиеся экспансией тринуклеотидных повторов, например болезнь Гентингтона), прионные заболевания (например болезнь Крейтцфельда – Якоба), заболевания мотонейронов (например боковой амиотрофический склероз) и некоторые другие. В тоже время, они все имеют в своей основе неправильную конформацию того или иного белка и, поэтому, объединяются в одну подгруппу конформационных патологий. Создание модели

нейродегенеративного заболевания человека с помощью технологии ИПСК предполагает два этапа: получение ИПСК из соматических клеток пациента с нейродегенеративным заболеванием, а затем их дифференцировка в нейроны определенных типов, связанных с моделируемой болезнью. Полученные нейроны можно использовать для скрининга с целью поиска новых лекарств. По сложившейся традиции работы с клеточными линиями или трансгенными организмами, в качестве контроля используется изогенная линия клеток или линейные животные, не несущие трансген. Несомненно, на начальных этапах изучения молекулярных механизмов некоторых процессов это имеет большое значение, так как позволяет обнаружить даже самые незначительные различия между нормой и патологией. В тоже время, такой подход оказывается сильно зависим от генетического фона конкретной клеточной линии, которые чаще всего являются трансформированными, или инбредных экспериментальных животных. Потенциальные терапевтические средства, испытанные на изогенных системах, показывают низкую эффективность при переходе в аллогенную систему. Применение генетического репрограммирования позволяет за относительно короткое время и небольшие финансовые средства провести исследования *ex vivo* эффективности и безопасности терапевтического средства на значительном количестве пациентов для выбора подгруппы пациентов, наиболее отвечающих на терапию [54]. Этот новый подход значительным образом приближает практическое использование научных исследований (from bench to bedside). Технология ИПСК также открывает перспективы в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний: в ИПСК возможно провести коррекцию генетической мутации, связанной с нейродегенеративным заболеванием, после чего возможно произвести любое необходимое количество адекватного клеточного материала для нейротрансплантации (рис. 2). Несмотря на молодость данного направления, уже удалось добиться определенных успехов в моделировании с помощью ИПСК заболеваний нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, боковой амиотрофический склероз, болезни Паркинсона и Гентингтона.

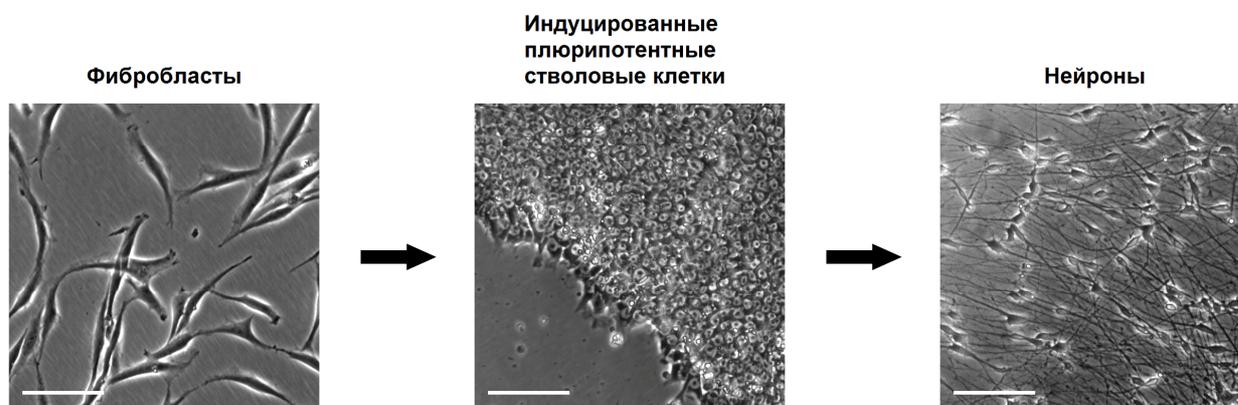


Рисунок 1. Получение пациент-специфических нейронов с использованием технологии ИПСК. По материалам [55].

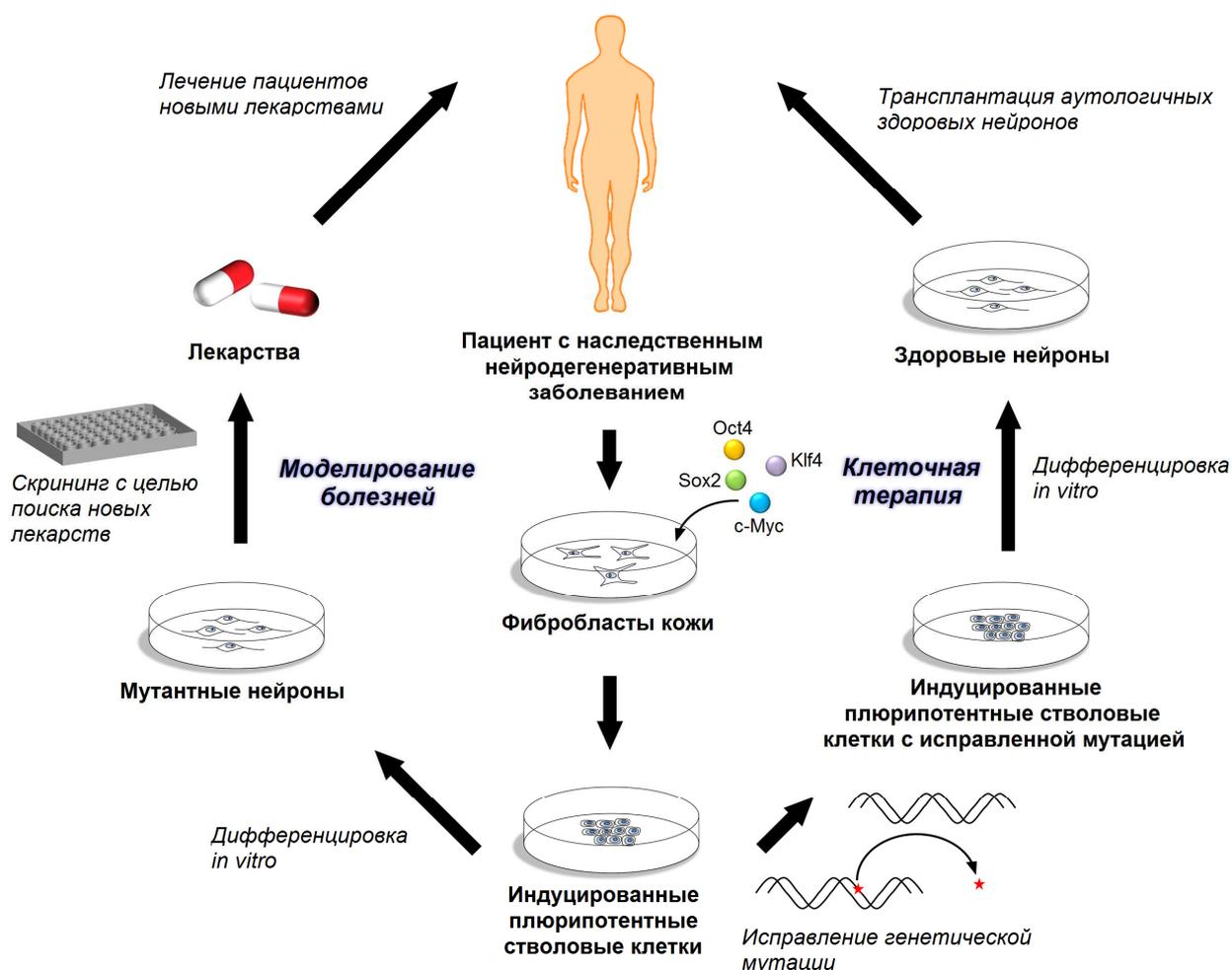


Рисунок 2. Схема использования ИПСК для моделирования нейродегенеративных заболеваний человека и клеточной терапии. По материалам [55].

1.5. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – это наиболее распространённое нейродегенеративное заболевание, которое приводит к прогрессирующему снижению памяти человека, способности общаться и выполнять ежедневные действия. Как правило, болезнь Альцгеймера обнаруживается у людей старше 65 лет [56], но существует и ранняя форма заболевания. Патология головного мозга при болезни Альцгеймера характеризуется массовой гибелью нейронов, в частности холинергических; образуются внутриклеточные нейрофибриллярные агрегаты, состоящие из тау-белка и внеклеточные агрегаты, состоящие из β -амилоида – продукта расщепления белка-предшественника амилоида (APP). Эти два вида нерастворимых белковых агрегатов сопровождаются хронической воспалительной реакцией и значительным окислительным стрессом [57]. Различными группами исследователей разработаны системы для поиска новых лекарств методом скрининга на нейронах, полученных из ИПСК [58,59]. Израиль

и соавторы получили ИПСК от двух пациентов с наследственной формой болезни Альцгеймера, от двух пациентов со спорадической формой болезни Альцгеймера и от двух здоровых пациентов. Из этих ИПСК были получены высокоочищенные культуры нейронов. По сравнению с нормой, нейроны от пациентов с болезнью Альцгеймера демонстрировали значительно более высокие уровни β -амилоида (1-40), фосфо-Tau (Thr 231) и активную гликогенсинтазу-киназу-3 β (aGSK-3 β). Также было обнаружено накопление огромных, Rab5-положительных, ранних эндосом. Обработка нейронов с помощью ингибиторов β -секретазы, но не γ -секретазы приводила к значительному снижению уровней фосфо-Tau (Thr 231) и aGSK-3 β [60]. Кондо и коллеги получили ИПСК от пациентов с наследственной и спорадической формами болезни Альцгеймера, после чего ИПСК дифференцировали в нейроны. Были обнаружены олигомеры β -амилоида, которые накапливались в нейронах с мутацией (APP)-E693 Δ , и в нейронах, полученных из ИПСК пациента со спорадической формой болезни Альцгеймера, что приводило к стрессу эндоплазматического ретикулума и окислительному стрессу. Обнаруженные олигомеры β -амилоида не были устойчивы к протеолизу, и обработка докозагексаеновой кислотой приводила к снижению реакции на стресс. Авторы работы предположили, что докозагексаеновая кислота может быть эффективным лекарством для некоторых подгрупп пациентов с болезнью Альцгеймера, что также подтверждается данными клинических исследований [61]. Спроул и соавторы получили ИПСК от здоровых пациентов и пациентов с наследственной ранней болезнью Альцгеймера, причина которой – мутация в гене *PSEN1*. ИПСК были дифференцированы в нейрональные предшественники. Мутантные дифференцированные нейроны продемонстрировали патологический процессинг APP, характерный для болезни Альцгеймера. Сравнительный анализ экспрессии генов позволил идентифицировать 14 дифференциально экспрессированных генов [62]. Йонг и коллеги успешно применили модель на основе ИПСК для исследования вклада мутации в гене *SORL1* при спорадической форме болезни Альцгеймера [63].

1.6. Шизофрения

Шизофрения – это полиморфное психическое расстройство или группа психических расстройств, характеризующееся нарушением процессов мышления и эмоциональных реакций. Болезнь обычно начинается в позднем подростковом или раннем юношеском возрасте. Шизофренические расстройства в целом отличаются характерными фундаментальными расстройствами мышления и восприятия, а также неадекватным или сниженным аффектом. Частота встречаемости составляет 4-6 случаев на 1000 человек населения [64]. Шизофрения является наследственным полигенным заболеванием, наследуемость достигает 80% [65].

Несмотря на неоднородность в клинических признаках, исследователи выявили общие нарушения, характерные для шизофрении с помощью посмертных исследований головного мозга пациентов, фармакологических и генетических исследований с использованием моделей на животных. Общие проявления болезни включают в себя сниженное количество синапсов, сниженный объем тел нейронов, увеличенные желудочки головного мозга, а также изменения в синапсах с участием дофамина, глутамата, и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [66,67]. Бреннанд и соавторы генетически репрограммировали фибробласты, полученные от пациентов с шизофренией. Полученные ИПСК были дифференцированы в нейроны. Мутантные нейроны имели по сравнению с нейронами дикого типа меньшее число связей и меньшее количество нейритов, сниженный уровень экспрессии белка PSD95 и рецепторов глутамата. Обработка нейронов нейролептиком локсапином, который обычно используют для терапии шизофрении, приводила к смягчению наблюдаемых фенотипических проявлений [68]. Робиксек и коллеги получили ИПСК из кератиноцитов волосяного фолликула от трех пациентов с диагнозом шизофрения и от двух здоровых пациентов. Далее ИПСК дифференцировали в дофаминэргические и глутаматэргические нейроны. Эксперименты по дифференцировке в дофаминэргические нейроны показали сниженную способность к дифференцировке, в то время как дифференцировка в глутаматэргические нейроны выявила неспособность мутантных нейронов созреть. Исследователи также наблюдали в мутантных нейронах нарушения структуры и функций митохондрий [69]. Машиетто и соавторы исследовали дифференциально экспрессирующиеся гены между нейронами, дифференцируемыми из ИПСК от пациентов с шизофренией и контрольных. Было обнаружено, что дифференциально экспрессированные гены связаны с развитием неокортекса, эти результаты согласуются с предположением, что критические метаболические изменения могут происходить в начале развития нервной системы, вызывая неправильное развитие мозга и, возможно, способствуя уязвимости к болезни [70].

1.7. Боковой амиотрофический склероз

Боковой амиотрофический склероз (также известен как болезнь Шарко, болезнь моторных нейронов) – это поздноразвивающееся прогрессивное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся специфической гибелью моторных нейронов спинного и головного мозга. Как правило, болезнь поражает людей в возрасте от 40 до 60 лет с частотой 1-2 случая на 100000 человек по всему миру. Ранние симптомы болезни: непроизвольные фасцикуляции мышц, их онемение, судороги, слабость в конечностях, затруднение речи – также свойственны многим более распространенным нейродегенеративным заболеваниям, поэтому

диагностика бокового амиотрофического склероза затруднена до тех пор, пока болезнь не развивается до стадии мышечной атрофии. Болезнь неуклонно прогрессирует, обычно с момента постановки диагноза до смерти проходит от двух до пяти лет, поскольку на поздних этапах поражается дыхательная мускулатура [71,72]. Подавляющее большинство возникающих случаев бокового амиотрофического склероза (приблизительно 90%) не имеют явной генетической наследуемости и характеризуются как спорадические. Примечательно, что более 170 охарактеризованных мутаций в конститутивно-экспрессирующемся гене *SOD1* приводит к доминантным, наследуемым формам бокового амиотрофического склероза. Введение мутантного аллеля этого гена в мышей и крыс позволяет моделировать основные симптомы данного заболевания на животных [73,74]. Однако связь между генетическим дефектом и гибелью моторных нейронов до сих пор не установлена. Было показано, что наблюдаемый токсический эффект на моторные нейроны не связан с нарушением или потерей антиоксидантной активности *SOD1* [75]. Исследования модельных животных [76,77], как и систем на основе ЭСК [78,79], показали участие клеток окружения моторных нейронов (например, астроцитов [78,79] и клеток микроглии [77]) в общей патологии заболевания. Кроме того, подобные модели свидетельствуют о непосредственной роли мутантного *SOD1* в формировании белковых агрегатов [78,80], также обнаруженных в клетках пациентов [81,82], и нарушении функции протеасом [83]. Таким образом, конформационные нарушения и взаимодействие мутантного *SOD1* со специфическими белками в моторных нейронах является на сегодняшний день основной гипотезой возникновения бокового амиотрофического склероза. При изучении бокового амиотрофического склероза у человека труднодоступность пораженных тканей остается большой проблемой, а результаты исследований при введении дополнительных копий гена не всегда могут воспроизвести действительную картину заболевания на молекулярном уровне. Модельные системы на основе ИПСК от пациентов с диагнозом бокового амиотрофического склероза позволяют получать пациент-специфичные моторные нейроны и клетки их окружения в любых требуемых количествах [84,85]. Кроме того, современные технологии исправления генетических дефектов, приводящих к развитию заболевания, предоставляют уникальную возможность для наиболее точного выявления молекулярных механизмов и ранних маркеров развития бокового амиотрофического склероза и разработке новых лекарственных препаратов.

1.8. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона является вторым по распространённости хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера. Болезнь

неизлечима, для нее характерны четыре двигательных нарушения: тремор, гипокинезия, мышечная ригидность, постуральная неустойчивость, а также вегетативные и психические расстройства. Заболевание встречается повсеместно, частота встречаемости колеблется от 60 до 140 человек на 100000 населения. Как правило, первые симптомы заболевания появляются в 55-60 лет. В ряде случаев болезнь может развиваться в возрасте до 40. Мужчины болеют несколько чаще, чем женщины. Существенных расовых различий в структуре заболеваемости не обнаружено. На клеточном уровне болезнь характеризуется массовой гибелью дофаминергических нейронов в чёрной субстанции и наличием в них телец Леви, что приводит к нарушению координации движений [86]. Этиология болезни Паркинсона окончательно не выяснена, однако факторами риска являются генетическая предрасположенность и воздействие факторов окружающей среды. Нгуен и соавторы получили ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона с мутацией G2019S в гене *LRRK2*. Дифференцированные из ИПСК нейроны продемонстрировали повышенную экспрессию ключевых генов ответа на окислительный стресс и белка альфа синуклеина. Тест на активацию каспазы-3 продемонстрировал более высокую чувствительность мутантных нейронов к воздействию таких химических агентов, как перекись водорода, протеасомный ингибитор MG132 и 6-гидроксидофамин по сравнению с нормальными нейронами [87]. Лю и коллеги с помощью нейронов, полученных из ИПСК с мутацией G2019S в гене *LRRK2*, обнаружили аномалии архитектуры клеточного ядра в мутантных нейронах. Далее они провели анализ посмертных срезов мозга пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона» и тоже обнаружили наличие аномалий клеточных ядер [88]. Чунг и соавторы с помощью нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона, подтвердили восстановление патологического фенотипа до нормы с помощью молекулы, которая была первоначально найдена в скрининге на дрожжах как потенциальное лекарство против болезни Паркинсона [89]. Охта и коллеги получили ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона (мутация I2020T в гене *LRRK2*). Дифференцированные из ИПСК мутантные нейроны секретировали меньше дофамина, демонстрировали более низкий уровень фосфо-АКТ, более высокий уровень Тау фосфорилирования и были более склонны к апоптозу по сравнению с нейронами дикого типа [90].

1.9. Болезнь Гентингтона

Болезнь (хорея, от греческого слова "*choreia*" – пляска) Гентингтона – одно из наиболее известных наследственных нейродегенеративных заболеваний. Распространенность хорей Гентингтона в странах Западной и Восточной Европы составляет 3-7 на 100000 человек населения. Клинические проявления заболевания развиваются обычно на 4-5 десятилетиях

жизни (средний возраст начала 35-44 лет). Дети больного относятся к группе риска с вероятностью передачи им мутантного гена 50%. Нейроморфологическая картина характеризуется прогрессирующей атрофией стриатума (полосатого тела), однако на поздних стадиях нейродегенерация наблюдается и в других областях головного мозга [2]. Основная функция полосатого тела – это планирование и коррекция движений, что отражается на симптоматике заболевания проявлением хореического гиперкинеза: непроизвольные, быстрые, нерегулируемые движения, усиливающиеся при попытке совершить целенаправленное действие. При болезни Гентингтона в первую очередь гибнут срединные шипиковые нейроны, они составляют 95% нейтронов стриатума и являются ГАМК-эргическими (секретируют ГАМК) [91]. Болезнь Гентингтона неуклонно прогрессирует и неизбежно заканчивается полным распадом личности и обездвиженностью больных, требующих постоянного ухода. [92]. Клонирование гена *HTT* (*хантингтин*), мутация в котором приводит к развитию хорее Гентингтона, в 1993 году [1] явилось первым важнейшим шагом в изучении молекулярных механизмов болезни Гентингтона. Оказалось, что при данном заболевании имеет место аномальное увеличение числа («экспансия») тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых (CAG) повторов в первом экзоне гена *HTT*. Ген *HTT* состоит из 67 экзонов и имеет длину более 200 т.п.н. Нормальные аллели гена *HTT* содержат 10-35 повторов (медиана – 18). Аллели с числом CAG-повторов 27-35 называют промежуточными или «мутабельными» [93]. Когда число повторов превышает 36, развивается болезнь Гентингтона, причем вследствие практически полной пенетрантности мутантного гена *HTT*, его носитель неизбежно заболевает. Различными группами исследователей были выявлены разнообразные значимые клинико-генетические корреляции при хорее Гентингтона. Показано, что с увеличением числа копий триплетов CAG снижается возраст начала хорее Гентингтона [94], возраст дебюта отдельных клинических симптомов и возраст смерти [95], а также ускоряется темп прогрессирования заболевания [96]. *Хантингтин* широко экспрессируется в различных органах и тканях. При хорее Гентингтона методом электронной микроскопии в нейронах стриатума выявляются характерные внутриядерные включения, представляющие собой высокомолекулярные амилоидоподобные агрегаты. Присутствие в составе включений мутантного белка НТТ подтверждается с помощью иммуногистохимического исследования [97]. Функция *HTT* до сих пор точно не известна, ее изучение представляется, таким образом, одной из актуальных проблем современной нейробиологии. Процесс патологии болезни Гентингтона связан с нарушениями целого ряда внутриклеточных процессов: аутофагии [98], поддержания гомеостаза ионов кальция в клетке [99] и функционирования митохондрий [100,101], но ключевые факторы до сих пор не выявлены. Недавние исследования методами магнитной резонансной и позитронно-эмиссионной томографии показали, что атрофия стриатума у

пациентов с мутацией в гене *HTT* обнаруживается даже за 10 лет до появления симптомов заболевания [102]. Первая попытка моделирования болезни Гентингтона с помощью ИПСК была предпринята в 2010 году, в этом исследовании впервые была продемонстрирована принципиальная возможность получения экспрессирующих DARPP-32 нейронов из ИПСК от пациента с болезнью Гентингтона, а также повышенная активность каспаз в культуре мутантных нейронов при удалении из культуральной среды ростовых факторов [103]. Позднее этой группой исследователей было продемонстрировано, что исправление мутации в гене *HTT* методом гомологичной рекомбинации, нормализует такие проявления болезни как повышенная активность каспаз в культуре мутантных нейронов при удалении из культуральной среды ростовых факторов, снижение экспрессии *BDNF* и сниженное потребление кислорода, что характеризует функционирование митохондрий [104]. Го и коллеги разработали селективный ингибитор (P110-TAT) митохондриального белка деления DRP1 и продемонстрировали на нейронах, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, что обработка клеток P110-TAT снижает фрагментацию митохондрий и препятствует снижению длины нейритов [105]. Камнасио и соавторы впервые получили целый набор ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, состоящий из трех линий от разных пациентов. Сравнительный анализ мутантных и нормальных нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, позволил выявить повышенное содержание лизосом в мутантных нейронах по сравнению с нормой [106]. Консорциум по изучению болезни Гентингтона с помощью ИПСК (The HD iPSC Consortium) собрал и использовал набор из 14 линий ИПСК, включающий линии от 3-х пациентов с болезнью Гентингтона с достаточно протяженными и значительно различающимся по длине CAG-повторами (60, 109, 180) и линии ИПСК от здоровых пациентов. Дифференцированные из ИПСК нейроны продемонстрировали ассоциированные с заболеванием патологические изменения в электрофизиологии, метаболизме и клеточной адгезии. Мутантные нейроны с 180 CAG-повторами также продемонстрировали повышенный уровень клеточной гибели по сравнению с нормой [107]. Чон и соавторы идентифицировали агрегаты хантингтина в нейронах, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, после длительного культивирования или интеграции в мозги крыс [108]. Сяо и коллеги использовали нейроны, полученные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона для демонстрации терапевтического эффекта XPro1595, ингибитора растворимого TNF- α . Они обнаружили, что XPro1595 защищал нейроны человека, полученные из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона, от цитокин-индуцированной токсичности [109]. Маттис и коллеги получили ИПСК от пациентов с большим количеством CAG-повторов (60 и более) с использованием вектора, не интегрирующего в геном клетки-хозяина, и обнаружили, что нейрональные предшественники восприимчивы к удалению из культуральной среды BDNF из-

за токсичности глутамата [110]. Лу и соавторы успешно использовали нейроны, полученные из ИПСК человека от пациентов с болезнью Гентингтона для подтверждения нейропротективного действия ингибитора АТМ KU-60019, предложенного в их работе в качестве потенциального лекарства от болезни Гентингтона [111]. Проведенный независимыми группами исследователей протеомный анализ нормальных и мутантных нейронов, полученных из ИПСК человека, выявил, что при наличии мутации в гене *HTT* значительно изменяют свою экспрессию гены, связанные с цитоскелетом [112,113].

1.10. Перспективы моделирования болезни Гентингтона с помощью ИПСК

Несмотря на определенные успехи в моделировании болезни Гентингтона с использованием ИПСК, до сих пор остается целый ряд открытых вопросов и нерешенных проблем. Так, никто не использовал в своих исследованиях полученные из человеческих ИПСК культуры срединных шипиковых нейронов стриатума – тип нейронов, который деградирует в первую очередь при болезни Гентингтона несмотря на примерно одинаковую экспрессию мутантного хантингтина во всех типах нейронов. Одна из гипотез такого проявления болезни Гентингтона предполагает, что белок Rhes, экспрессия которого локализована в стриатуме, сумоэлирует мутантный хантингтин, и, таким образом, предотвращает агрегацию мутантного белка, что может являться защитным механизмом [114]. Следовательно, построение модели болезни Гентингтона на основе срединных шипиковых нейронов стриатума, полученных из человеческих ИПСК с малым избыточным количеством CAG-повторов в гене *HTT* является важной задачей для адекватного моделирования классической формы болезни Гентингтона *in vitro*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточный материал

В работе были использованы биоптаты кожи от 3 пациентов женского пола с клинически диагностированной болезнью Гентингтона, полученные из ФБГУ «Научный центр неврологии» в г. Москва. В качестве контрольных линий ПСК использовали полученные ранее в лаборатории линии iPSRG2L (ИПСК из фибробластов кожи здорового пациента мужского пола), endo-iPS 12 (ИПСК из эндотелиальных клеток здорового пациента женского пола) и hESM01 (женская линия ЭСК).

2.2. Культивирование фибробластов

Фибробласты растили в среде для культивирования фибробластов следующего состава: DMEM (ПанЭко, РФ), 15% фетальная бычья сыворотка (FBS) (Hyclone, США), 2 mM глутамин (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ). Клетки растили в чашках Петри (Corning, США). Среду меняли раз в 2-4 дня. Клетки пассировали с использованием 2.5 мг/мл трипсина (Hyclone, США).

2.3. Получение культуры фибробластов из биоптатов кожи человека

После подписания информированного согласия пациента выполнялась биопсия кожи предплечья. Биоптат хранили в среде для культивирования фибробластов (DMEM (ПанЭко, РФ), 15% FBS (Hyclone, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ)) не более 5 часов. Эксплантат в капле среды помещали на крышку чашки Петри (Corning, США) и острым стерильным скальпелем разрезали на небольшие кусочки (размер порядка 1 мм³). Полученные кусочки помещали каждый в отдельную чашку Петри диаметром 35 мм (Corning, США) и прижимали сверху стерильным покровным стеклом (MENZEL-GLASER, Германия). На стекло наливали среду для культивирования фибробластов: 5 мл на одну чашку с диаметром 35 мм. Раз в неделю меняли среду на свежую среду для культивирования фибробластов (5 мл), стараясь не сдвинуть покровное стекло. Примерно через 3 недели рассевали получившийся монослой фибробластов.

2.4. Замораживание и оттаивание клеток

Клетки снимали с чашки таким же образом, как и при пересеве. Затем суспендировали в 0.5 мл FBS (Hyclone, США) и аккуратно переносили в криовиалу, содержащую 0.5 мл охлажденной до 4-12°C среды для заморозки клеток (80% фетальная бычья сыворотка (Hyclone, США), 20% ДМСО (ПанЭко, РФ)). Сразу после этого криовиалу переносили на 24 часа на -70°C. На следующий день криовиалы перемещали в жидкий азот для продолжительного хранения. В 1 мл среды замораживали клетки одной 35 мм чашки с 50%-80% монослоя (около 200 тыс).

2.5. Культивирование ЭСК и ИПСК человека в бесфидерных условиях

Культивирование проводили в среде для культивирования ЭСК и ИПСК человека mTeSR1 (StemCell Technologies, Канада) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве подложки для культивирования использовали Matrigel (BD Biosciences, США). Приготовление покрытых матригелем культуральных чашек и планшетов производили в соответствии с инструкциями производителя. Клетки пассировали с использованием 1 мг/мл диспазы (Invitrogen, США).

2.6. Культивирование ЭСК и ИПСК человека на фидере

Среда для культивирования ЭСК и ИПСК человека в фидерных условиях имела следующий состав: DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% Serum replacement (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ), bFGF 4 нг/мл (PeproTech, США). В качестве подложки для культивирования (фидера) использовали митотически инактивированные эмбриональные фибробласты мыши. Смену среды производили каждый день. Клетки пассировали каждые 5-7 дней с использованием 1 мг/мл диспазы (Invitrogen, США).

2.7. Приготовление фидера

Среда для культивирования эмбриональных фибробластов мыши имела следующий состав: DMEM (Hyclone, США), 10% FBS (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ). Эмбриональные фибробласты мыши размораживали, растили не

более чем до 4-го пассажа, смену культуральной среды проводили через день. Готовили раствор митомицина С (Sigma-Aldrich, США) 1 мг/мл в PBS (ПанЭко, РФ), фильтровали через 0.22 мкм целлюлозно-ацетатный фильтр (Corning, США). В среду эмбриональным фибробластам мыши добавляли митомицин С в конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки снимали с помощью трипсина (Hyclone, США) в соответствии с инструкциями производителя. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и высевали в необходимой плотности на покрытую желатином культуральную посуду. Фидер готов к использованию на следующий день.

2.8. Покрытие желатином культуральной посуды

Готовили раствор 0.1% желатина (Sigma-Aldrich, США) в воде mQ, автоклавировали раствор в течение 45 минут при 121°C. В культуральную посуду наливали раствор желатина и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре; непосредственно перед использованием желатин удаляли.

2.9. Сборка лентивирусов

Клетки Phoenix рассеивали на 10 см чашки Петри (Corning, США) покрытые желатином (Sigma-Aldrich, США), примерно 2000000 клеток на чашку. Для культивирования клеток Phoenix использовали среду следующего состава: DMEM (ПанЭко, РФ), 5% FBS (Hyclone, США) (предварительно прогретая 1 час при 56°C), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, РФ), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ). На следующий день клетки трансфицировали реагентом TurboFect (Fermentas, США) в пропорции 22 мкл TurboFect + 16 мкг ДНК на 5000000 клеток. Соотношение плазмид по массе от общего количества ДНК: Rev 19%, RRE 37%, VSV-G 7%, vector 37%. Процедуру трансфекции выполняли по протоколу производителя реагента TurboFect, после культивировали клетки 48 часов. Далее раз в 24 часа собирали культуральный супернатант, содержащий вирусные частицы, в течение 2 дней, фильтровали его через 0.45 мкм фильтр и хранили на +4°C. По окончании сбора супернатанта его разливали по порциям и хранили при -80°C.

2.10. Инфекция клеток лентивирусными векторами

Клеткам в среду культивирования добавляли Polybrene (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 8 мкг/мл для повышения эффективности вирусной инфекции. Через час добавляли необходимое количество вирусных частиц в среду клеткам.

2.11. Определение титра лентивирусов

Клетки НЕК293 инфицировали супернатантами, содержащими в себе вирусные частицы, в различных разведениях. Через 48 часов после заражения клетки фиксировали и проводили иммуногистохимический анализ с помощью антител к соответствующему антигену. По проценту окрашенных клеток определяли титр вирусов.

2.12. Получение ИПСК

Данный протокол был разработан в процессе выполнения диссертационного исследования. Фибробласты кожи человека высевали в количестве около 40000 клеток на 35 мм чашку Петри (Corning, США) в среде для культивирования фибробластов следующего состава: DMEM (ПанЭко, РФ), 15% фетальная бычья сыворотка (FBS) (Hyclone, США), 2 mM глутамин (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ), bFGF 2 нг/мл (ProTech, США). Через 2 дня после посева клетки инфицировали четырьмя оригинальными лентивирусами LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4, MOI 10, 10, 2.5, 5 соответственно. В среду клеткам добавляли вальпроовую кислоту (VPA) (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 1 mM и VIX-01294 (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 2 мкM в течение первой недели после инфекции. Через 5 дней после инфекции клетки пересеивали 1 к 12 на 35 мм культуральные чашки (Corning, США) в среде для культивирования фибробластов. На следующий после посева день среду меняли на среду для получения ИПСК человека, которая имела следующий состав: DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% Serum replacement (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), bFGF 4 нг/мл (ProTech, США), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, РФ). Затем клетки культивировали в этой среде в течение 10-12 дней, среду меняли раз в 2 дня. К этому моменту на чашках образовалось множество колоний клеток с различной морфологией. Эти колонии механически отбирали и культивировали отдельно в условиях культивирования ЭСК и ИПСК человека.

2.13. Окраска антителами клеточных культур

Клетки на чашке промывали 2 раза PBS (ПанЭко, РФ), фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) 20 минут при комнатной температуре, промывали PBS-0.1%Tween20 (Sigma-Aldrich, США) 3 раза. Блокировали неспецифическую сорбцию антител инкубацией в течение 30 минут в растворе PBS-0.1%Tween20, содержащем 5% FBS (HyClone, США), 2% сыворотки козы (HyClone, США) и 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре. Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS-0.1%Tween20, содержащем 5% FBS и 2% сыворотки козы, инкубировали 1 час при комнатной температуре, отмывали 3 раза по 5 минут в PBS-0.1%Tween20. Вторичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 минут при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 минут в PBS-0.1%Tween20. Инкубировали с DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндола дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США) 0.1 мкг/мл в PBS 10 минут, отмывали 2 раза в PBS-0.1%Tween20. Список использованных в работе первичных антител приведен в таблице 1. Микрофотографии окрашенных антителами клеточных культур получали с помощью программного обеспечения Axiovision и флуоресцентных микроскопов Axiovert 40 CFL (Zeiss AG, Германия) и Axio Imager A1 (Zeiss AG, Германия).

Таблица 1. Список антител, использованных в работе.

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Разведение
LC3B	ab48394	Abcam	1:4000
Giantin	ab24586	Abcam	1:1000
Calnexin	ab31290	Abcam	1:1000
Lamin B1	ab16048	Abcam	1:1000
Lamin A	ab8980	Abcam	1:100
β -III-Tubulin	ab7751	Abcam	1:500
DARPP-32	ab40801	Abcam	1:100
HTT	ab109115	Abcam	1:1000
GAT-1	ab64645	Abcam	1:100
MAP2	ab5392	Abcam	1:5000
PAX6	ab78545	Abcam	1:200
NCAM1	ab6123	Abcam	1:200
FOXP2	ab16046	Abcam	1:6000

ENO2	ab79757	Abcam	1:100
OCT4	ab18976	Abcam	1:700
Cytokeratin(PAN)	M0821	DAKO	1:100
CD105	M3527	DAKO	1:500
AFP	A0008	DAKO	1:500
CD56	R7251	DAKO	1:40
IgG2b	X0951	DAKO	1:250
SSEA-4	MC-813-70	DSHB	1:250
SOX2	cell signalling 3579	Cell Signaling Technology	1:400
Nestin	MAB5326	Millipore	1:100
EM48	MAB5374	Millipore	1:50

2.14. Агарозный гель-электрофорез нуклеиновых кислот

Гель-электрофорез нуклеиновых кислот проводили в 0.8-2.5% агарозных гелях, на основе буфера Tris-Acetate-EDTA (Sigma-Aldrich, США) с 10 мкг/мл бромистого этидия (Sigma-Aldrich, США). Нуклеиновые кислоты детектировали с помощью трансиллюминатора (Vilber Lourmat, США) в ультрафиолете (302нм).

2.15. Выделение хромосомной ДНК

Клетки, предварительно отмытые от среды в PBS, помещали в 0.5 мл буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 25 мМ ЭДТА pH 8.0, 0.5% SDS и 0.1 мг/мл протеиназы К. Инкубировали в течение ночи при 56°C. ДНК экстрагировали равным объемом фенола/хлороформа, затем равным объемом хлороформа и преципитировали 1/12 объема 7.5 М ацетата аммония, 3 объемами этанола. После двукратной промывки в 70% этаноле ДНК растворяли в буфере TE или в воде mQ.

2.16. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток с помощью QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, США) согласно прилагающимся инструкциям.

2.17. Выделение тотальной РНК из клеточных культур

Для выделения тотальной РНК из клеточных культур использовали MiniRNA kit (QIAGEN, США), процедуру выполняли согласно прилагающемуся инструкциям. Обработку ДНКазой осуществляли в соответствии с протоколом производителя непосредственно на колонках, с использованием прилагающихся к набору MiniRNA kit ДНКазы и буфера.

2.18. Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных шестинуклеотидных праймеров (Amersham Biosciences, США), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США), Ribonuclease Inhibitor (Promega, США), dNTPs (Fermentas, США) согласно прилагающимся инструкциям. На одну реакцию брали 0.5-1 мкг тотальной РНК.

2.19. Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР-амплификации продуктов реакции обратной транскрипции брали 0.05-0.1 часть реакционной смеси. ПЦР-амплификацию проводили с помощью ScreenMix (Евроген, РФ) или набора реагентов для амплификации ДНК GenPak PCR Core (Лаборатория Изоген, РФ) согласно инструкциям производителя. Список праймеров, использованных в работе, приведен в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для характеристики ИПСК.

Ген	Последовательности праймеров
GAPDH	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' 5'TTCACACCCATGACGAACAT3'
OCT4	5'CGACCATCTGCCGCTTTGAG3' 5'CCCCCTGTCCCCCATTCCTA3'
SOX2	5'TCCTGATTCCAGTTTGCCTC3' 5'GCTTAGCCTCGTCGATGAAC3'
c-Мус	5'AGTAATTCCAGCGAGAGGCA3' 5'AGGCTGCTGGTTTTCCAATA3'
NANOG	5'CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC3' 5'TGGAAGGTTCCAGTCGGGTTCAACC3'

FOXD3	5'CAAGCCCAAGAACAGCCTAGTGAA3' 5'TGACGAAGCAGTCGTTGAGTGAGA3'
HESX1	5'ACCTGCAGCTCATCAGGGAAAGAT3' 5'AAAGCAGTTCTTGGTCTCGGCCT3'
SALL4	5'TGTGACTTTACGGGTTCTGAGCCA3' 5'TGTA CTGGTTCACACAACAGGGT3'
HTT	5'CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC3' 5'GGCTGAGGAAGCTGAGGAG3'

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованных для характеристики дифференцированных нейронов.

Ген	Последовательности праймеров	Размер продукта ПЦР амплификации
GAPDH	5'TTTTGCCTCGCCAGCCGAG3' 5'TAAGCAGTTGGTGGTGCAGGAGGC3'	508 п.н.
PPP1R1B	5'AGATCCGGCGCAGGAGACCAACG3' 5'CCCTAGCAGGCGAGGGGAAGAG3'	642 п.н.
GAD1	5'GATATTTTCTCCTGGGGGCG3' 5'GGCCACACTGAATTGCCTTG3'	632 п.н.
DRD1	5'CAGGGGCTTTGAGAGAGACG3' 5'AGCAGGGAATAGGGGTCAGT3'	467 п.н.
BCL11B	5'ATGCCAGAATAGATGCCGGG3' 5'ATGTTCTCCTGCTTGGGACAG3'	445 п.н.
CALB1	5'GCAAACAAGACTGTTGATGACAC3' 5'AAGAGCAAGATCCGTTCGGTAC3'	363 п.н.
SST	5'GCTTTAGGAGCGAGGTTCCGG3' 5'CATTCTCCGTCTGGTTGGGT3'	292 п.н.
RASD2	5'GATACCTCTGGCAACCACCC3' 5'AAGTAGGCGCAGTTCTCGTC3'	290 п.н.
PENK	5'TGACACTTTGCACTTGGCTG3' 5'TGGCTTTCTTCCGGTTTGCT3'	268 п.н.
ANO3	5'GGCCCAAACCCAATGGTTC3' 5'TGTGGTGGAAACGCTGCTAT3'	255 п.н.

PDYN	5'TCATGTTCCCCTCCACCACA3' 5'CTTGGCCAGCTCACTGTAGG3'	254 п.н.
TRPC1	5'CCTACACTGGTGGCAGAAGG3' 5'GCAAAGCAGGTGCCAATGAA3'	299 п.н.
TRPC3	5'CAGGGTGAAAACCACCCAGT3' 5'TGAGCACAACAGCTATGGCA3'	365 п.н.
GRIA1	5'GAAGGTGATGGCTGAGGCTT3' 5'TCGGATGCCGTCATGTTTCA3'	241 п.н.
GRIA2	5'CCTTTATGCGGCAAGGATGC3' 5'GGCCGTAGTCCTCACAAACA3'	314 п.н.
GRIK2	5'CACCTCCGAAACCCGATTCA3' 5'CTGTGAGGCCTTCCCAATGT3'	210 п.н.
GRIK5	5'TGCCAGGTGCTCTCATCAC3' 5'CAGATGCTGGGCTAGAGGAG3'	256 п.н.
GRIN1	5'CAAGTATGCGGATGGGGTGA3' 5'CTTGACGTACACGAAGGGCT3'	253 п.н.
GRIN2B	5'TCACTCCCTTAATCTGTCCGTC3' 5'ACATGAGATCACAGATGCGGG3'	334 п.н.

2.20. Приготовление препаратов метафазных хромосом ЭСК и ИПСК человека

За 8-12 часов до фиксации клеткам, культивируемым в бесфидерных условиях, меняли среду. За 1-3 часа до фиксации к клеткам добавляли колцемид (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 0.1-0.2 мкг/мл. После инкубации с колцемидом отбирали среду, промывали 2 раза PBS (ПанЭко, РФ), после чего добавляли 0.05% раствор трипсина (Nucclone, США) и инкубировали при комнатной температуре 1-1.5 минут. Отбирали раствор трипсина, наливали среду, суспендировали клетки и переносили в 15 мл пробирку. Добавляли 5 объемов 0.075 М раствора KCl комнатной температуры и инкубировали 20 минут при 42°C. Добавляли фиксатор (метанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 6:1) в соотношении с объемом клеточной суспензии 1:40 и мешали переворачиванием. Клеточную суспензию центрифугировали при 4°C 200-400 g в течение 4 минут, затем отбирали надосадочную жидкость, оставляя примерно 0.5 мл, и ресуспендировали клетки. Добавляли 1 мл холодного фиксатора (метанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 6:1), перемешивали и центрифугировали при 4°C 600 g в течение 4 минут. Отбирали надосадочную жидкость, оставляя примерно 0.5 мл. Добавляли 1мл холодного фиксатора (метанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) перемешивали и

центрифугировали при 4°C 600 g в течение 4 минут. Отбирали надосадочную жидкость, оставляя 100-500 мкл. Клетки суспендировали. На холодное мокрое предметное стекло наносили 10-20 мкл клеточной суспензии, позволяли ей растечься по стеклу, собирали капли жидкости с краев стекла фильтровальной бумагой. Затем препараты высушивали на термоплате при 40-60°C.

2.21. GTG-дифференциальное окрашивание

Высушенные на воздухе препараты метафазных хромосом выдерживали несколько дней при комнатной температуре. Препараты обрабатывали 0.05% трипсином (Hyclone, США) в течение 1-5 минут при комнатной температуре, промывали фосфатным буфером (ПанЭко, РФ). Затем препараты окрашивали в красящем растворе Гимза (ПанЭко, РФ) 5% в течение 1-5 минут, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре.

2.22. Формирование эмбрионных телец

Колонии ПСК снимали диспазой 1 мг/мл (Invitrogen, США), диссоциировали на фрагменты 400-600 клеток, в среде для культивирования эмбрионных телец (DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% FBS (Hyclone, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ)) переносили в чашки Петри с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США).

2.23. Культивирование эмбрионных телец

Эмбрионные телца культивировали в среде для культивирования эмбрионных телец следующего состава: DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% FBS (Hyclone, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ). Среду меняли раз в 2 дня.

2.24. Спонтанная дифференцировка ЭСК и ИПСК

Эмбрионные телца в возрасте 10-20 дней помещали на покрытые желатином (Sigma-Aldrich, США) чашки Петри (Corning, США) в среде для культивирования эмбрионных телец. Эмбрионные телца прикреплялись к желатиновой подложке и начиналась миграция клеток из

эмбрионидных телец на поверхность чашки. Через 2-3 недели образовывались обширные области дифференцированных клеток.

2.25. Тест на формирование тератом

ИПСК промывали средой DMEM/F12 (ПанЭко, РФ), добавляли диспазу (Life technologies, США) 5 мг/мл в DMEM/F12 и в течение 6 минут инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C. Далее колонии ИПСК механически отделяли от подложки и переносили в 15 мл пробирку (Corning, США). Центрифугировали 5 минут 100-200 g, супернатант удаляли, после чего клетки ресуспендировали в DMEM/F12, центрифугировали 5 минут 100-200 g, супернатант удаляли. Промывали аналогичным образом еще 2 раза. Затем клетки смешивали с матригелем (BD Biosciences, США) и коллагеном (Sigma-Aldrich, США). Примерно 5×10^6 клеток инъецировали подкожно в заднюю лапу иммунодефицитной мыши nude/nude. Через 10-12 недель после инъекции сформировавшиеся тератомы извлекали, промывали 1 раз с помощью PBS (ПанЭко, РФ), и фиксировали с помощью фиксирующего раствора Боуина. Далее готовили парафиновые срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином. После чего выполняли гистологический анализ.

2.26. Дифференцировка ПСК человека в срединные шипиковые нейроны стриатума

Данный протокол был разработан в процессе выполнения диссертационного исследования. Для приготовления культуральных сред использовали следующие реагенты: DMEM/F12 (ПанЭко, РФ), Neurobasal-A (Life Technologies, США), пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ), L-глутамин (Life Technologies, США), N2 (Life Technologies, США), B27 (Life Technologies, США), recombinant human noggin (PeproTech, США), recombinant human bFGF (PeproTech, США), recombinant human BDNF (PeproTech, США), SB431542 (Stemgent, США), dorsomorphin (Stemgent, США), purmorphamine (Stemgent, США), Forskolin (Stemgent, США). Для того, чтобы дифференцировать ПСК человека в срединные шипиковые нейроны стриатума, использовали четыре различные культуральные среды следующих составов: К-1 (DMEM/F12, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин, N2, noggin 80 нг/мл, bFGF 4 нг/мл, SB431542 8 мкМ, dorsomorphin 2 мкМ), К-2 (DMEM/F12, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин, N2, noggin 80 нг/мл, bFGF 4 нг/мл, purmorphamine 0.65 мкМ), К-3 (DMEM/F12, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин, N2, bFGF 10 нг/мл, purmorphamine 0.65 мкМ, Forskolin 4 мкМ), К-4 (Neurobasal-A, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин, B27, BDNF 10 нг/мл, Forskolin 4 мкМ). До дифференцировки ПСК человека культивировали в бесфидерных

условиях: в среде mTeSR1 (StemCell Technologies, Канада) на матригеле (BD Biosciences, США). Клетки культивировали до состояния 80-90% монослоя, после чего культуральную среду меняли на смесь mTeSR1:K-1 20:80% и культивировали в таких условиях в течение двух дней. Далее клетки культивировали в среде K-1 в течение 5-7 дней, затем в среде K-2 в течение 7-9 дней. К этому моменту формировались структуры, называемые нейрональные розетки. Далее клетки культивировали в среде K-3 в течение 20-50 дней, в процессе культивирования на среде K-3 нейрональные розетки механически пересевали и культивировали по протоколу культивирования нейрональных предшественников. Чтобы получить зрелые нейроны, нейрональные предшественники переводили на среду K-4 и культивировали в таких условиях не менее 10 дней.

2.27. Культивирование нейрональных предшественников

Нейрональные предшественники культивировали на матригеле (BD Biosciences, США) в среде K-3 не более чем до четвертого пассажа. Пересев нейрональных предшественников выполняли следующим образом: клетки отделяли от подложки с помощью 1 мг/мл акъютазы (Life Technologies, США), суспендировали пипетированием, центрифугировали 4.5 минуты при 200 g. Супернатант сливали и ресуспендировали клетки в DMEM/F12 (ПанЭко, РФ), после чего центрифугировали 4.5 минуты при 200 g, супернатант сливали и ресуспендировали клетки в среде K-3. После этого клетки либо сеяли на чашки Петри, покрытые матригелем, либо обогащали популяцию нейрональных предшественников следующим образом: суспензию клеток наливали на покрытую матригелем чашку Петри, инкубировали 5-10 минут при комнатной температуре. Нейрональные предшественники прикрепляются к подложке медленнее, чем другие типы клеток в культуре, поэтому суспензия с неприкрепившимися клетками обогащена нейрональными предшественниками. После инкубации клетки высевали на покрытые матригелем чашки Петри.

2.28. Электронная микроскопия

Подготовка клеток к электронной микроскопии проводилась как описано в [115]. В основном, протокол заключался в том, что клетки выращивали на специальной пластиковой пленке (Agar Scientific Ltd., Великобритания) 2x2 см² в среде K-4. Далее клетки фиксировали с помощью 2.5% глутарового альдегида в культуральной среде в течение 15 минут, а затем 2.5% глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном натриевом буфере (pH 7.2) в течение 1 часа. Далее следовали три промывки тем же буфером по 5 минут и вторичная фиксация в 1% OsO₄ и 0.8%

ферроцианида калия в течение 1 часа и три промывки водой mQ, после чего проводилась инкубация в 1% водном растворе ацетата уранила-натрия (Serva, Heidelberg, Германия) в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого образцы были обезвожены серией промывок этанолом (30%, 50%, 70%, 96% в течение 10 минут, и 100% в течение 20 минут) и ацетона (дважды, в течение 20 минут), далее образцы заливали Agar 100 Resin (Agar Scientific Ltd., Великобритания). Ультратонкие срезы получали с помощью Leica Ultracut ультрамикротом (Leica, Германия) и окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-100SX (JEOL, Япония). Для анализа формы ядер процент нормальных ядер или ядер с глубокими выемками в ядерной мембране рассчитывали на микрофотографиях срезов, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

2.29. Fura-2 кальциевый имиджинг

Кальциевый имиджинг проводили как описано в [115]. Подготовка к нему заключалась в том, что нейроны, выращенные на покровных стеклах, загружали 5 мкМ Fura-2AM в присутствии 0.025% Pluronic в течение 40 минут при 37°C. Загруженные клетки освещали переменным с частотой 2 Гц 340 и 380 нм возбуждающим светом. Интенсивность флуоресценции измеряли при длине волны 510 нм с использованием InCyt Basic I/P (Intracellular Imaging Inc., США). Изменение концентрации цитозольного кальция оценивали как отношение интенсивностей флуоресценции при 340 и 380 нм длинах волн возбуждающего света.

2.30. Электрофизиологические исследования

Анализ депо-управляемого транспорта кальция проводили как описано в [115]. Токи кальция регистрировали с помощью метода patch-clamp в конфигурации whole-cell. Измерения проводили с использованием Axopatch 200B Amplifier (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектрода было порядка 5-10 МОм. Токи были получены на 5 кГц и далее подвергнуты цифровой фильтрации на частоте 500 Гц. Программа pClamp6 (Axon Instruments, США) была использована для сбора и анализа данных. Во всех экспериментах, удерживающий потенциал был -40 мВ. Каждые 5 секунд мембранный потенциал был снижен до -100 мВ (в течение 30 мс), и 200 мс напряжение линейно повышали до +100 мВ. Зарегистрированные токи были нормированы на емкость клетки (10-30 пФ). Раствор в пипетке содержал (в мМ) 125 CsCl, 10 EGTA-Cs, 30 HEPES-Cs, 4.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 4 Na-ATP, pH 7.3. Внеклеточный раствор

содержал (в mM) 140 NMDG-Asp, 10 BaCl₂, 30 HEPES-Cs, 0.01 нифедипин и 0.001 тетродотоксин, pH 7.3. Депо-управляемые токи вызывали применением 1 мкМ тапсигаргина (Tocris Bioscience, Великобритания) во внешнем растворе.

2.31. Проточная цитометрия клеток, окрашенных LysoTracker

Клетки культивировали в 48-луночном планшете в культуральной среде K-4. Клетки отделяли от культуральной посуды с помощью TrypLE™ Express (Life Technologies, США), суспендировали с помощью пипетирования, TrypLE™ Express инактивировали с помощью среды (DMEM/F12, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин, FBS 10%), после чего считали количество клеток с помощью клеточного счетчика Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Клетки центрифугировали при 400 g, надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали клетки в среде (DMEM/F12, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин) до концентрации 2000000 клеток/мл. Клетки инкубировали в течение 5 минут при 37°C, LysoTracker® Green DND-26 (Invitrogen, США) добавляли до конечной концентрации 75 нМ и инкубировали в течение 30 минут при 37°C в темноте. Клетки центрифугировали при 400 g, надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали клетки в охлажденном льдом растворе (PBS -Mg -Ca, 0.1% BSA). Клеткам добавляли антитела к CD56 (в разведении 1:25) или изотипический контроль Mouse IgG1 (в разведении 1:166), в течение 40 минут на льду, центрифугировали при 400 g, надосадочную жидкость сливали и клетки ресуспендировали в охлажденном льдом PBS (PBS -Mg -Ca, 0.1% BSA), центрифугировали при 400 g, надосадочную жидкость сливали и клетки ресуспендировали в охлажденном льдом растворе (PBS -Mg -Ca, 0.1% BSA) до концентрации 2000000 клеток/мл и подвергали флуоресцентно-активированный сортировке клеток с помощью проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter, США).

2.32. Химические вещества для количественных экспериментов

В работе были использованы следующие химические вещества в обозначенных конечных концентрациях: 4-8 mM LiCl (Sigma-Aldrich, США), 5-10 мкМ MG132 (Abcam, США), 12.5-25 мкМ LY294002 (Tocris Bioscience, Великобритания), 250-1000 нМ Thapsigargin (Tocris Bioscience, Великобритания), 30-3000 нМ EVP4593 (Sigma-Aldrich, США), 100 мкМ DTT (Life Technologies, США), 25-50 мкМ Dimebon (Sigma-Aldrich, США), 50 мкМ 2-APB (Sigma-Aldrich, США), 2 мкМ Ruthenium Red (Tocris Bioscience, Великобритания).

2.33. Количественный анализ формы клеточных ядер

Клетки культивировали в 48-луночном планшете в культуральной среде K-4, за 24 часа до окрашивания клетки обрабатывали химическими соединениями или не обрабатывали. Клетки промывали PBS (ПанЭко, РФ), и фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 минут при комнатной температуре, промывали PBS-0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, США) 2 раза, инкубировали с DAPI (4', 6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США) 0.1 мг/мл в PBS в течение 10 минут, затем промывали 2 раза в PBS, 0.1% Tween 20. Окрашенные клетки фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 40 CFL (Zeiss AG, Германия). Коэффициент округлости клеточного ядра (Roundness) рассчитывали по формуле: $Roundness = ([\text{Периметр ядра}]^2) / (4 \cdot \pi \cdot [\text{Площадь ядра}])$ с помощью специально разработанного программного обеспечения, реализованного на языке программирования BlitzPlus. Для каждой точки эксперимента было подсчитано не менее 700 ядер.

2.34. Количественный анализ гибели клеток

Клетки культивировали в 96-луночном планшете с плоским прозрачным дном и черными стенками (Corning, США) в среде K-4, за 24 часа до окрашивания клетки обрабатывали химическими соединениями или нет. Гибель клеток анализировали с помощью MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию измеряли с помощью планшет-ридера DTX 880 (Beckman Coulter, США). Чтобы оценить уровень гибели клеток (LoCD) в лунке, исходные значения в относительных флуоресцентных единицах обсчитывали с использованием формулы: $([\text{Citotoxicity в обсчитываемой лунке}] - [\text{Citotoxicity в контрольной лунке без клеток}]) / ([\text{Viability в обсчитываемой лунке}] - [\text{Viability в контрольной лунке без клеток}])$. Чтобы проанализировать влияние химического соединения на LoCD в модели MG132-индуцированной гибели клеток, использовали четыре лунки с одинаковыми клетками и различными обработками химическими веществами, чтобы рассчитать эффект использовали формулу: $([\text{LoCD лунки с MG132 10 мкМ и химическим веществом}] - [\text{LoCD лунки с химическим веществом}] - [\text{LoCD лунки с MG132 10 мкМ}] + [\text{LoCD лунки без MG132 и химического вещества}])$.

2.35. ВЭЖХ анализ секрети ГАМК

Культуральную среду К-4 заменяли на DMEM/F12. Нейроны инкубировали в течение 30 минут при 37°C в DMEM/F12. После инкубации надосадочную жидкость собирали и хранили при -70°C, нейронам наливали культуральную среду К-4 и возвращали в инкубатор. ВЭЖХ-анализ содержания аминокислот в супернатантах был выполнен в виде стандартного медицинского теста на 32 аминокислоты компанией ООО "Лаборатория Хроматографических систем".

2.36. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор

Фрагмент ДНК лигировали с линейризованным по сайту клонирования плазмидным вектором с помощью Т4 ДНК-лигазы (Promega, США) согласно инструкциям производителя, после чего выполняли химическую трансформацию бактерий продуктами лигирования с использованием компетентных клеток *E.coli* штамм XL1-Blue (Евроген, РФ). Химическую трансформацию выполняли согласно протоколу производителя. Далее клетки высевали на твердую среду (LB-агар), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), IPTG (250 мкМ) и X-Gal (50 мкг/мл), и помещали чашки Петри в термостат (37°C) на 10-15 часов.

2.37. Секвенирование фрагментов ДНК по Сэнгеру

Продукты ПЦР-амплификации фрагмента исследуемой последовательности ДНК клонировали в плазмидный вектор pGEM®-T Easy (Promega, США). Полученные клоны плазмид секвенировали по Сэнгеру с праймера SP6 в ЦКП «Генетический полиморфизм» ИОГен РАН.

2.38. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов

Мутантные и контрольные ПСК дифференцировали параллельно, после чего из клеток выделяли РНК. Далее выполняли полнотранскриптомный анализ экспрессии генов на микрочипах Human HT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя в двух технических повторностях. Биоинформационный анализ проводили с использованием GenomeStudio (Illumina, США). Нормализацию производили усреднением без вычитания фона. Гены считали дифференциально экспрессированными, при выполнении условий $\text{DiffScore} > 25$ и $p < 0.05$ для детекции во всех образцах. Всего было

проведено 3 независимых параллельных дифференцировки, в итоговый список дифференциально экспрессированных генов были включены только те гены, которые показывали дифференциальную экспрессию во всех 3 экспериментах. Классификацию дифференциально экспрессированных генов выполняли с помощью онлайн инструмента <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> в режиме «two unranked lists of genes» [116,117].

2.39. Статистический анализ

Данные на графиках приведены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Для сравнения средних значений между двумя группами, статистический анализ проводили с применением одностороннего Т-теста Стьюдента или одностороннего Т-теста Уэлча для неравных дисперсий. Каждый эксперимент повторялся по крайней мере 3 раза, уровни значимости $p < 0.05$ считали значимыми. Для каждого конкретного эксперимента дополнительная информация указана в описании метода и результатов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оптимизация генетического репрограммирования соматических клеток человека

К моменту начала исследования уже были опубликованы работы о получении ИПСК из многих типов соматических клеток человека: фибробластов кожи [118], кератиноцитов [27], эндотелиальных клеток [31], нейрональных стволовых клеток [119], CD34⁺ клеток [120] и некоторых других [121,122]. Для большинства генетических заболеваний человека, к которым относится и болезнь Гентингтона, мутация, вызывающая патологию, является наследственной и содержится во всех клетках пациента, поэтому выбор исходного типа соматических клеток для получения ИПСК определялся, в первую очередь, технологическими критериями: процедурой взятия биоматериала и технологией генетического репрограммирования. Из описанных в литературе типов соматических клеток, которые были успешно использованы для получения ИПСК, малоинвазивным методом возможно получать кератиноциты, фибробласты кожи и клетки крови. Ни один из этих типов клеток не предоставляет серьезных преимуществ при генетическом репрограммировании. В данном диссертационном исследовании фибробласты были выбраны исходным материалом для получения ИПСК, так как их легко культивировать и выделять из биологического материала [122]. В большинстве работ по моделированию болезни Гентингтона с помощью ИПСК также использовали фибробласты кожи [53,106,107,123]. Известно, что стехиометрическое соотношение репрограммирующих факторов оказывает влияние на качество и количество получаемых ИПСК [124]. Для того, чтобы исследовать влияние количества и соотношений лентивирусных векторов на эффективность генетического репрограммирования, была произведена инфекция культур фибробластов человека различными комбинациями лентивирусных векторов, несущих в себе гены транскрипционных факторов OCT4, SOX2, c-Мус и KLF4. Инфекция 100000 фибробластов вирусным вектором LeGO-hOCT4 с MOI 5 (т.е. 10 инфицирующих единиц на одну клетку), LeGO-hSOX2-IRES-GFP с MOI 5, LeGO-hc-Мус с MOI 5 и LeGO-hKLF4 с MOI 5 приводила к формированию 2-3 колоний ИПСК, инфекция LeGO-hOCT4 с MOI 10, LeGO-hSOX2-IRES-GFP с MOI 10, LeGO-hc-Мус с MOI 10 и LeGO-hKLF4 с MOI 10 приводила к формированию 12-15 колоний ИПСК, а инфекция LeGO-hOCT4 с MOI 10, LeGO-hSOX2-IRES-GFP с MOI 10, LeGO-hc-Мус с MOI 2.5 и LeGO-hKLF4 с MOI 5 продемонстрировала лучший результат с формированием 20-25 колоний ИПСК. Следовательно, количество и соотношение репрограммирующих факторов, содержащихся в вирусных частицах действительно влияет на количество клонов ИПСК, получаемых в процессе репрограммирования. После инфекции клетки пересевали и переводили в условия культивирования ПСК. ПСК могут расти на фидере различной природы [22,125] и в

бесфидерных условиях [126,127]. Для того, чтобы выяснить какие условия культивирования наиболее способствуют поддержанию репрограммированных клеток, было изучено влияние различных подложек: пластик, желатин, матригель и митотически инактивированные эмбриональные фибробласты мыши. Для этого человеческие фибробласты через 5 дней после инфекции из одной чашки Петри рассеивали в одинаковой плотности на чашки Петри, покрытые желатином, матригелем, митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши, а также на чашку без какого-либо покрытия. Культуральная среда во всех случаях была одна и та же – среда для культивирования ЭСК в фидерных условиях. К моменту, когда клоны ИПСК были сформированы, производилась оценка количества клонов методом прямого подсчета. Количество клонов на чашках с различными подложками отличалось от среднего по всем типам подложек не более чем на 50%. Следовательно, тип подложки не является критичным для формирования клонов ИПСК, получаемых в процессе генетического репрограммирования. Одним критериев полного репрограммирования является замолкание экспрессии экзогенных транскрипционных факторов репрограммирования [128]. мРНК, транскрибируемая с вирусного вектора LeGO-hSox2-IRES-GFP, помимо кодирующей части транскрипционного фактора SOX2, также содержит кодирующую часть зеленого флуоресцентного белка, которому предшествует альтернативный сайт посадки рибосомы (IRES). Это приводит к тому, что с одной мРНК транслируются сразу два белка, что позволяет отслеживать транскрипционную активность трансгенов. В процессе генетического репрограммирования клеток каждый день производился мониторинг экспрессии GFP с использованием флуоресцентного микроскопа. Мониторинг наличия флуоресценции в репрограммирующихся клетках показал, что белок GFP появляется на второй день после инфекции клеток и начинает пропадать после 12 дня, что является следствием замолкания экспрессии трансгенов (рис. 3А). Далее был изучен эффект комплекса химических соединений: вальпроевой кислоты (VPA) и VIX-01294 на генетическое репрограммирование фибробластов до плюрипотентного состояния. Эти соединения по литературным данным значительно повышают эффективность генетического репрограммирования [129,130]. Соединение VPA является ингибитором ДНК-метилтрансферазы, а VIX-01294 ингибирует G9a гистон-метилтрансферазу. Полагают, что повышение эффективности генетического репрограммирования под действием этих веществ обусловлено снижением барьеров изменения эпигенетического состояния, которое происходит в процессе репрограммирования соматической клетки до плюрипотентного состояния. Для исследования действия комплекса химических соединений в среду клеткам добавляли VPA (конечная концентрация в среде 1 мМ) и VIX-01294 (конечная концентрация в среде 2 мкМ) в течение недели сразу после инфекции и в течение третьей недели после инфекции. Добавление указанных химических соединений на

первой неделе после инфекции приводило к увеличению количества клонов более чем на порядок, в то время как их добавление на третьей неделе не вызывало значительного увеличения количества клонов ИПСК (рис. 3Б).

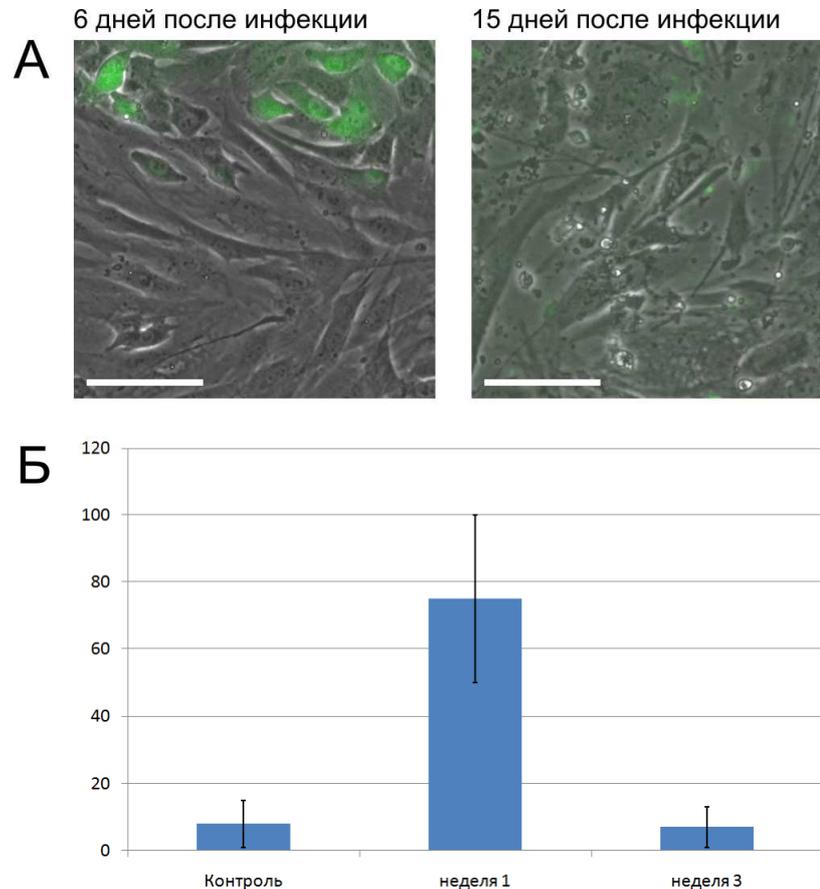


Рисунок 3. (А) – Флуоресценция GFP в инфицированных клетках на 6 и 15 день после инфекции. (Б) – Диаграмма воздействия химических соединений VPA и VIX-01294 на количество клонов ИПСК: контроль – без использования химических соединений; неделя 1 – добавление химических соединений в течение первой недели после инфекции; неделя 3 – добавление химических соединений в течение третьей недели после инфекции.

3.2. Получение фибробластов кожи от пациентов с хореей Гентингтона с малым количеством избыточных повторов в мутантном аллеле гена *хантингтина*

Известно, что трансгенные модели болезни Гентингтона с малым количеством избыточных CAG-повторов в гене *хантингтине* плохо подходят для исследований болезни из-за отсутствия или слабого проявления функционального фенотипа [131]. Так, например трансгенные по человеческому мутантному *хантингтину* мыши YAC72 (72 CAG повтора) демонстрировали двигательные нарушения только с 9 месяца жизни, в то время как у мышей

УАС46 (46 CAG повторов) не наблюдали никаких отклонений от нормы в течение всего периода наблюдений, с рождения и до возраста 20 месяцев [132]. Между тем, болезнь Гентингтона проявляется у людей с 36 и более CAG-повторами в гене *хантингтине*. Действие мутантного *хантингтина* с большим и малым числом CAG-повторов могут принципиально различаться, именно поэтому модельная система на основе линий ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона с небольшим уровнем амплификации CAG повтора может стать ценным инструментом для изучения молекулярно-генетических механизмов болезни. В исследование были включены три пациента женского пола с клинически диагностированной болезнью Гентингтона и малым (40-47) количеством CAG-повторов в мутантном аллеле, проходящие наблюдение в ФБГУ «Научный центр неврологии» в г. Москва. Количество CAG-повторов было диагностировано клинически и методом ПЦР. Для выбранной группы пациентов были установлены первичные культуры фибробластов из биоптатов кожи (рис. 4). Фибробласты культивировали до 3 пассажа, при этом на первом, втором и третьем пассажах часть культуры подвергали криоконсервации для создания банка первичных клеточных культур и сохранения клеточного материала.

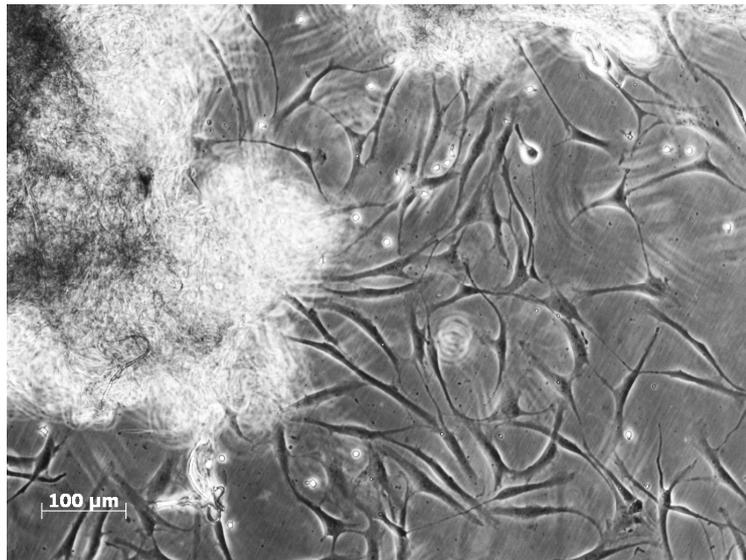


Рисунок 4. Фибробласты кожи человека мигрируют из фрагмента биоптата, взятого у пациента с болезнью Гентингтона.

3.3. Проведение генетического репрограммирования фибробластов кожи пациентов с болезнью Гентингтона

ИПСК получали согласно протоколу, разработанному и оптимизированному в процессе выполнения данного диссертационного исследования. Этот протокол описан в разделе

«Материалы и методы». Для получения ИПСК использовали фибробласты 2-3 пассажа. Из 40000 фибробластов, изначально взятых в эксперимент, получали около 100 клонов ИПСК. Таким образом, эффективность получения ИПСК составила около 0.2%. Такая же эффективность наблюдалась при использовании данного протокола для получения ИПСК из фибробластов дикого типа, следовательно, наличие мутации в гене *хантингтине* не влияет на эффективность генетического репрограммирования, что согласуется с более ранними исследованиями [53,106,107,110,123]. Несколько десятков клонов для каждой линии фибробластов отбирали и культивировали отдельно. Полученные клоны ИПСК были морфологически сходны с ЭСК человека: клетки имели размер порядка 20 мкм, большое соотношение ядро-цитоплазма, росли монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками (рис. 5А). Далее был проведен анализ кариотипа клонов ИПСК методом GTG-дифференциального окрашивания, большинство клонов ИПСК продемонстрировали нормальный кариотип 46 XX, они были отобраны для дальнейшей работы (рис. 5Б).

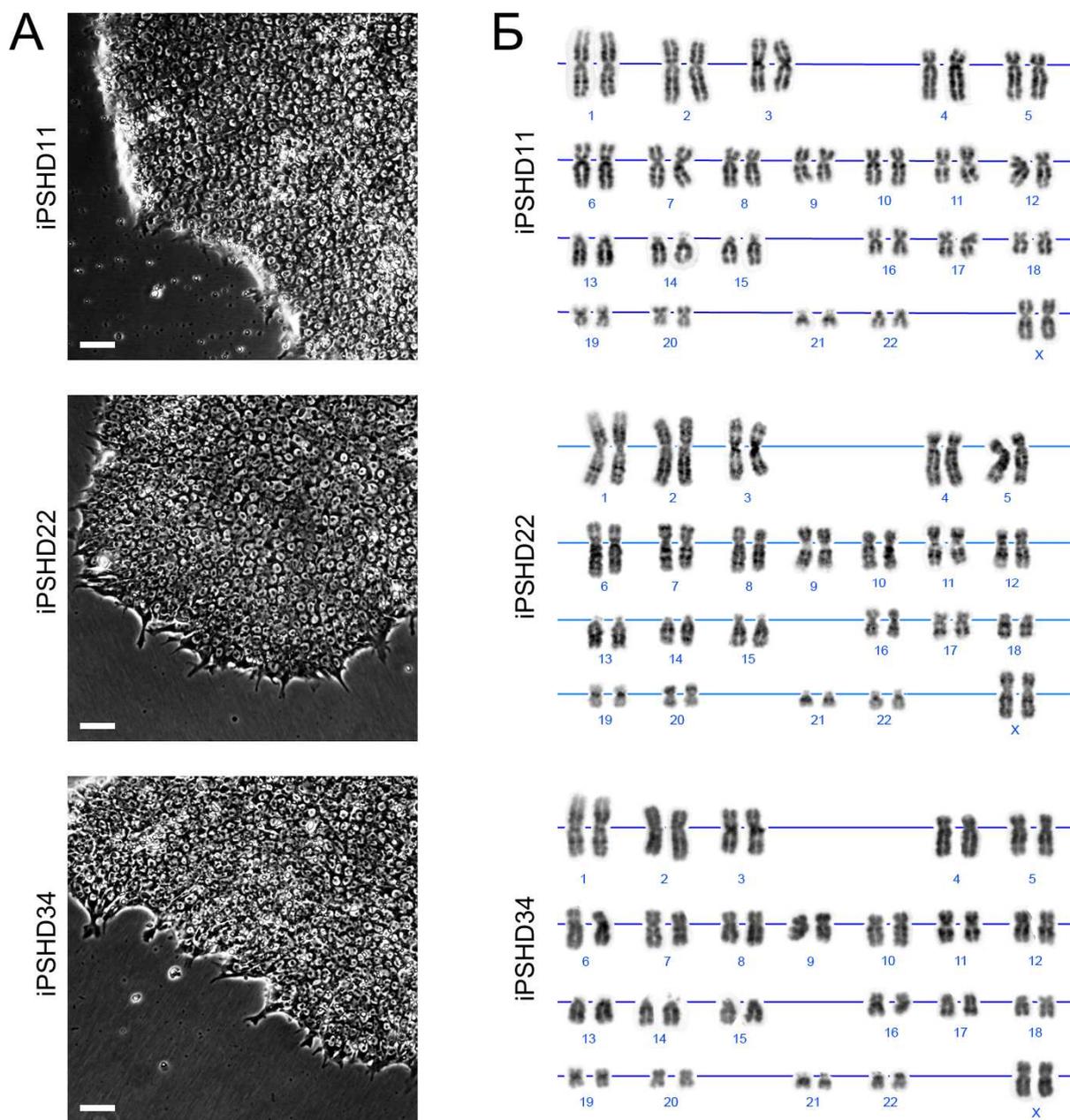


Рисунок 5. (А) – Микрофотография колоний ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с болезнью Гентингтона. Масштабная линейка 50 мкм. (Б) – Кариотип клонов ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с болезнью Гентингтона, GTG-бэндинг.

3.4. Молекулярная характеристика ИПСК

В процессе репрограммирования до плюрипотентного состояния происходят значительные изменения в экспрессии генов и синтезе белка. Молекулярную характеристику ИПСК проводили двумя различными методами: окрашивание антителами и ПЦР с обратной транскрипцией. Показано, что полученные клоны ИПСК специфично окрашиваются на маркеры ПСК OCT4 и SSEA-4. (рис. 6А, 6Б). OCT4 и SSEA-4 является общепринятыми

маркерами ПСК [46]. Методом ПЦР с обратной транскрипцией была показана экспрессия специфичных для ПСК генов: *OCT4*, *SOX2*, *c-Мyc*, *NANOG*, *FOXD3*, *HESX1*, *SALL4* на таком же уровне, что и в ЭСК человека. Для нормировки количества кДНК использовали уровень экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*, в качестве положительного и отрицательного контролей использовали кДНК из ЭСК и фибробластов кожи человека (рис. 6В).

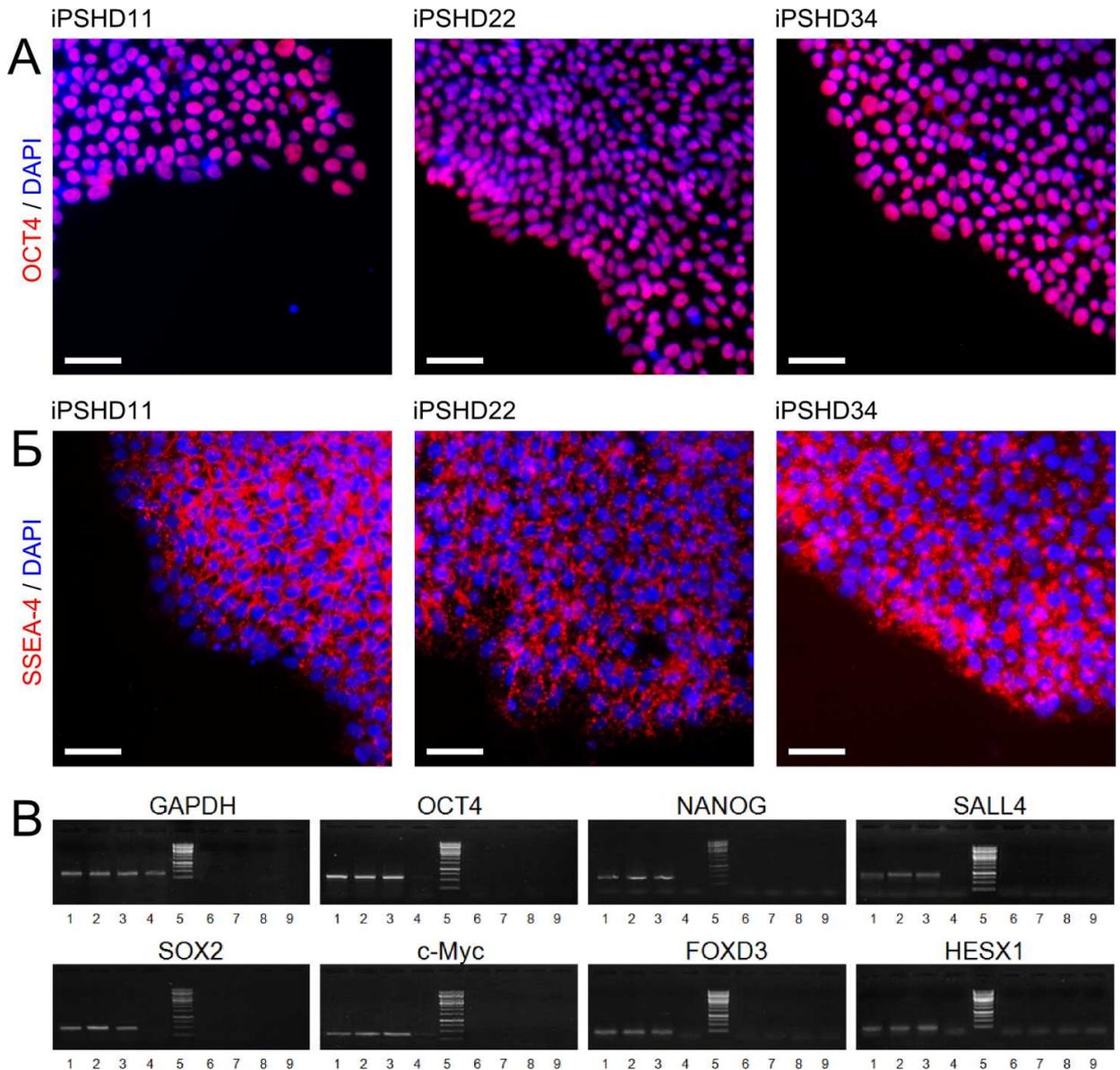


Рисунок 6. (А) – Окраска антителами клонов ИПСК на маркер плюрипотентных клеток *OCT4* (красный), синий цвет – краситель DAPI (ядра клеток). (Б) – Окраска антителами клонов ИПСК на маркер плюрипотентных клеток *SSEA-4* (красный), синий цвет – DAPI (ядра клеток). (В) – Электрофореграммы продуктов ОТ-ПЦР на гены: *GAPDH*, *OCT4*, *SOX2*, *c-Мyc*, *NANOG*, *FOXD3*, *HESX1*, *SALL4*. Все электрофореграммы имеют одинаковую структуру: 1 – ЭСК OT+, 2 – iPSHD21 OT+, 3 – iPSHD22 OT+, 4 – фибробласты OT+, 5 – маркер, 6 – ЭСК OT-, 7 – iPSHD21 OT-, 8 – iPSHD22 OT-, 9 – фибробласты OT-. ОТ – обратная транскриптаза.

3.5. Функциональная характеристика ИПСК

Тесты на способность к дифференцировке во все типы клеток организма считают ключевыми в доказательстве плюрипотентности клеток. Для ИПСК мыши в качестве основного теста на плюрипотентность обычно используется тест на формирование жизнеспособных химер [46]. В случае клеток человека исследователям доступны только менее строгие тесты, такие как *in vitro* дифференцировка в клетки трех зародышевых листков, способность к образованию эмбрионидных тел, а в случае *in vivo* формирование тератома-подобных новообразований при введении ПСК иммунодефицитным мышам. Для всех клонов ИПСК взятых в исследование были успешно получены эмбрионидные тельца, которые через 2 недели культивирования в суспензии переводили на культивирование в адгезионной форме. Эмбрионидное тело представляет начальный этап спонтанной дифференцировки и позволяет определить в своем составе клетки, принадлежащие разным зародышевым листкам. В результате такой спонтанной дифференцировки образовались клетки различной тканевой принадлежности. Через две недели после начала культивирования в адгезионной форме клетки фиксировали и проводили окрашивание клеточных культур с использованием антител к белкам-маркерам трех зародышевых листков. В культуре спонтанно дифференцировавшихся клеток находили клетки, положительно окрашивающиеся на маркер эктодермы пан-цитокератин (Cytokeratin), мезодермы CD105 и энтодермы α -фетопротеин (AFP) (рис. 7А). Также для части клонов был выполнен тест на формирование тератом. ИПСК инъецировали подкожно в заднюю лапу иммунодефицитных мышей, после чего, через 10-12 недель формировались тератомы, в которых находили ткани, принадлежащие к трем зародышевым листкам (рис. 7Б). Таким образом, полученные ИПСК способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков и являются плюрипотентными.

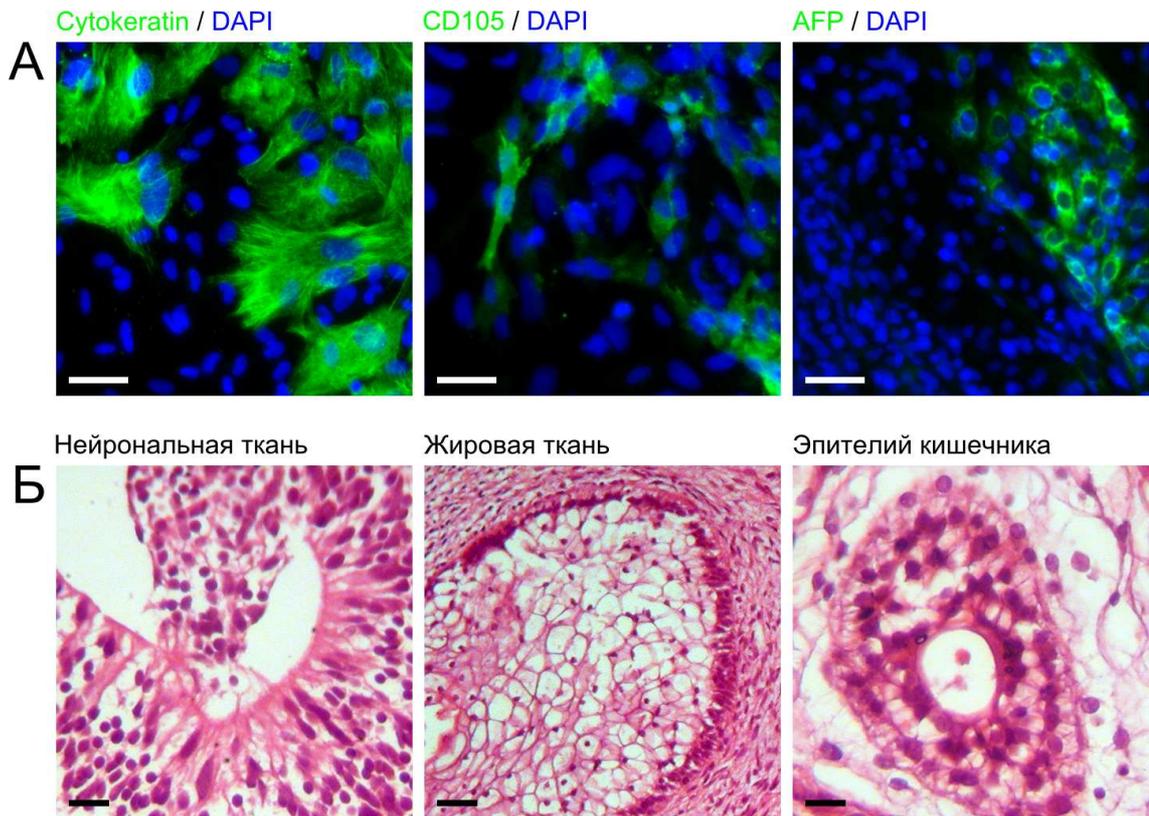


Рисунок 7. (А) – Окраска антителами продуктов спонтанной дифференцировки клона ИПСК iPSHD22 на маркеры клеток трех зародышевых листков (зеленый цвет), ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 50 мкм. (Б) – Окраска гематоксилином и эозином гистологических срезов тератомы, выращенной из клона ИПСК iPSHD22. Масштабная линейка 50 мкм.

3.6. Характеристика набора клеточных линий для моделирования болезни Гентингтона

Среди полученных и охарактеризованных клонов ИПСК для дальнейших исследований от каждого пациента было выбрано по одному клону: iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34. Количество CAG-повторов в обоих аллелях гена *HTT* каждой отобранной линии ИПСК было установлено методом секвенирования по Сэнгеру. iPSHD11 имеет 40/17 CAG-повторов, iPSHD22 имеет 47/16 CAG-повторов, iPSHD34 имеет 42/27 CAG-повторов. В дополнение к линиям ИПСК с мутацией в гене *HTT* были выбраны контрольные линии ПСК из ранее полученных в лаборатории: endo-iPS 12, iPSRG2L [31,133] и линия ЭСК hESM01 [134]. Отсутствие амплификаций в гене *HTT* в контрольных линиях было подтверждено методом ПЦР (рис. 8).

На данный момент уже опубликовано значительное количество линий ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона [53,106,107,110,123], а также ЭСК [135,136] с мутацией в гене *хантингтине*, но эти линии в основном содержат большое количество CAG-повторов в мутантном аллеле. Полученный в данной диссертационной работе набор ИПСК представляет

гетерозиготы с малым количеством избыточных CAG-повторов, что является представлением типичной мутации в гене *хантингтине* на различном генетическом фоне. Контрольные линии включали ИПСК из фибробластов от здорового пациента мужского пола (iPSRG2L), чтобы исключить возможное влияние пола на наблюдаемые явления, женские ИПСК из эндотелиальных клеток от здорового пациента (endo-iPS 12), чтобы исключить влияние соматической памяти, и женская линия ЭСК (hESM01), чтобы исключить возможное влияние лентивирусной трансдукции.

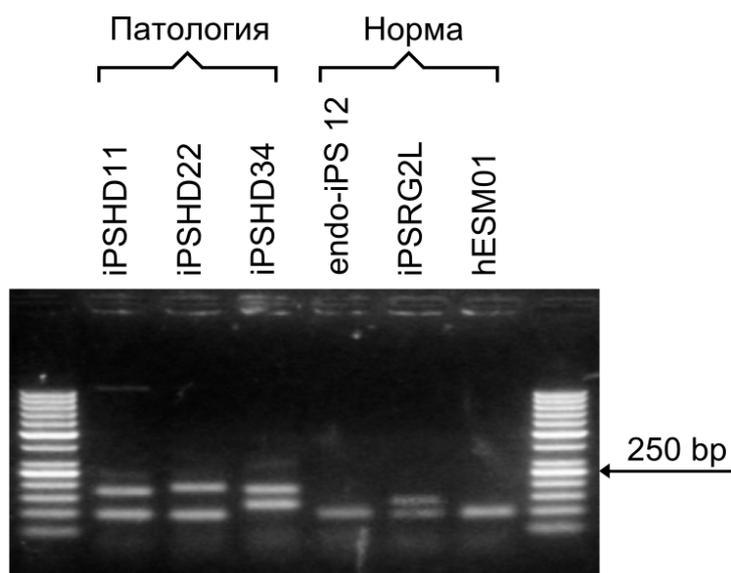


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации участка гена *HTT*, содержащего CAG-повтор с геномной ДНК использованных в работе патологических (iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34) и нормальных (iPSRG2L, endo-iPS 12, hESM01) линий ПСК. Более высокие полосы соответствуют большей экспансии CAG-повтора.

3.7. Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека в клетки, имеющие характеристики срединных шипиковых нейронов стриатума

Несмотря на то, что мутантный хантингтин экспрессируется практически во всех типах клеток организма, нейродегенерации подвержен в первую очередь вполне определенный тип нейронов – срединные шипиковые нейроны стриатума. Именно по этой причине для создания адекватной модели болезни Гентингтона важно выполнять направленную дифференцировку в срединные шипиковые нейроны стриатума. Однако, во всех предыдущих исследованиях по моделированию болезни Гентингтона с помощью ИПСК использовали культуры клеток с невысоким содержанием срединных шипиковых нейронов стриатума и, в большинстве

случаев, ИПСК с большим количеством CAG повторов (72 и более) в гене *хантингтине*, что скорее соответствует ювенильной форме болезни Гентингтона [53,106,107,110,123].

В литературе были описаны эффективные протоколы дифференцировки ПСК в направлении срединных шипиковых нейронов стриатума [49,137]. Обри и соавторы получали из ЭСК порядка 60% нейронов, экспрессирующих белок DARPP-32, известный специфический маркер срединных шипиковых нейронов стриатума [138]. В этом протоколе помимо рекомбинантных факторов и малых молекул используется сокультивирование с мышинными стромальными клетками (MS5) [137]. Ма и коллеги разработали более совершенный протокол дифференцировки ЭСК человека в срединные шипиковые нейроны стриатума [49]. Они начинали дифференцировку с ЭСК в фидерных условиях, индуцировали дифференцировку в нейрональном направлении, после чего индуцировали дифференцировку в клетки латерального ганглионарного бугорка с использованием 200 нг/мл рекомбинантного белка Sonic Hedgehog (SHH), который играет важную роль в развитии нервной системы, или химического соединения *putmorphamine* в концентрации 0.65 мкМ, что эквивалентно по своему действию 200 нг/мл рекомбинантного белка SHH. Затем клетки дифференцировали в зрелые нейроны с использованием рекомбинантных факторов BDNF, GDNF, IGF и химических соединений: вальпроевой и аскорбиновой кислот. Порядка 80% нейронов, получаемых в процессе дифференцировки по этому протоколу, экспрессировали маркер DARPP-32.

В процессе выполнения работы был разработан эффективный протокол дифференцировки ПСК человека в клетки, имеющие характеристики срединных шипиковых нейронов стриатума, включающий в себя четыре стадии (рис. 9А). До начала дифференцировки ПСК человека культивировали в среде mTeSR1 и на Матригеле в качестве подложки. На первом этапе ПСК человека направляли в примитивные нейроэпителиальные клетки с помощью рекомбинантного белка *poggin* и химических соединений SB431542, и *dorsomorphin*, этот этап занимал 7-9 дней. На втором этапе примитивные нейроэпителиальные клетки продолжали поддерживать с помощью рекомбинантного белка *poggin* и направляли с использованием химического соединения *putmorphamine* 0.65 мкМ в клетки латерального ганглионарного бугорка, которые являются предшественниками срединных шипиковых нейронов стриатума. Второй этап занимал также 7-9 дней. На третьем этапе клетки латерального ганглионарного бугорка отделяли от других типов клеток, спонтанно возникающих в процессе дифференцировки, поддерживали и наращивали. Для этого нейрональные розетки механически отделяли от других клеток и наращивали, пассируя с помощью акьютазы, но не более чем до четвертого пассажа. В процессе наращивания клетки можно либо продолжать растить, либо заморозить, либо подвергнуть терминальной дифференцировке. Этап наращивания клеток занимал 20-50 дней. На этапе наращивания клетки

латерального ганглионарного бугорка демонстрировали экспрессию маркерных генов SOX2, PAX6, FOXP2, NCAM1, ENO2, Nestin (рис. 9Б). На четвертом этапе клетки дифференцировали в зрелые нейроны с помощью рекомбинантного фактора BDNF 10 нг/мл в течение как минимум 10 дней. Зрелые нейроны показали способность существовать в культуре как минимум 9 месяцев. Иммуноцитохимический анализ показал, что до 95% полученных клеток экспрессировали нейрональный маркер TUBB3, до 80% клеток, экспрессирующих TUBB3, также экспрессировали DARPP-32 (рис. 9В). Дифференцированные нейроны также продемонстрировали экспрессию НТТ и синаптического транспортера ГАМК GAT1 (рис. 9В). В результате проведенных работ был разработан протокол, который позволял получать не только до 80% нейронов, демонстрирующих экспрессию широко используемого маркера срединных шипиковых нейронов стриатума DARPP-32, что сравнимо с эффективностью протокола Ма и коллег [49], а также клетки на промежуточных стадии нейрональной дифференцировки, которые можно хранить в замороженном состоянии.

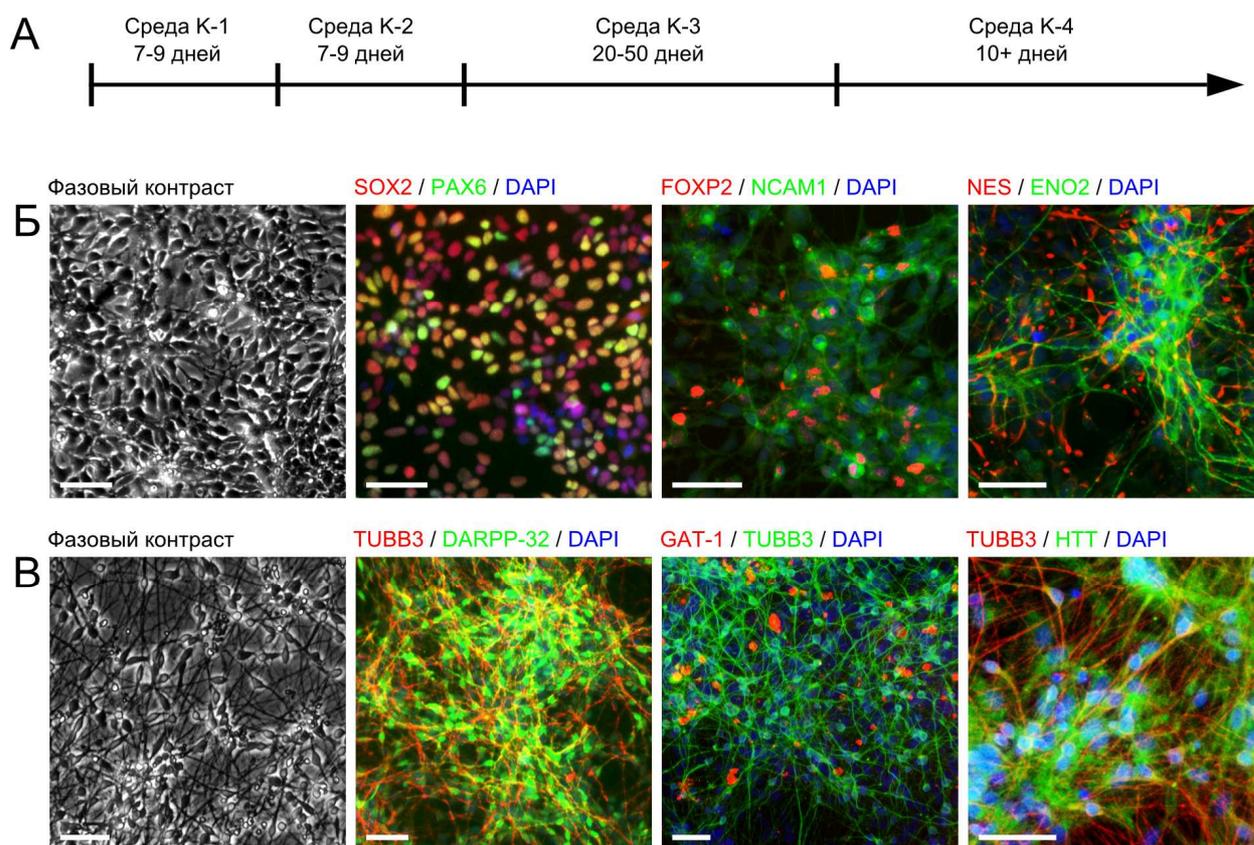


Рисунок 9. (А) – Схематическое представление протокола дифференцировки ИПСК в направлении срединных шипиковых нейронов стриатума. (Б) – Нейрональные предшественники в фазовом контрасте, и окрашенные антителами к нейрональным маркерам SOX2, PAX6, FOXP2, NCAM1, ENO2, и Nestin, ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет), масштабная линейка 50 мкм. (В) – Дифференцированные нейроны в фазовом контрасте, и

окрашенные антителами к DARPP-32, TUBB3, GAT1, и HTT, ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет), масштабная линейка 50 мкм.

Более того, разработанный протокол отличается тем, что дифференцировка начинается с ПСК, культивируемых в среде mTeSR1 на матригеле, и среды для дифференцировки содержат меньше ростовых факторов и химических компонентов, что является явным преимуществом, так как в отличие от более ранних работ среды состоят из полностью охарактеризованных компонентов. Хотя дифференцированные нейроны были положительны по DARPP-32, который является общепринятым маркером срединных шипиковых нейронов стриатума [138], представлялось необходимым полнее охарактеризовать фенотип получившихся нейронов на транскрипционном уровне. Для этого был произведен поиск генов, специфичных для срединных шипиковых нейронов стриатума с помощью онлайн ресурсов <http://www.brain-map.org/> [139] и <http://amazonia.transcriptome.eu/> [140], и составлен следующий набор генов, специфичных для срединных шипиковых нейронов стриатума: *PPP1R1B*, *GAD1*, *DRD1*, *BCL11B*, *CALB1*, *SST*, *RASD2*, *PENK*, *ANO3*, *PDYN*. Часть генов из этого набора, такие как *PPP1R1B*, *GAD1*, *BCL11B*, *CALB1*, ранее использовали для характеристики дифференцированных из ИПСК срединных шипиковых нейронов стриатума [108,141]. По одной из гипотез ген *RASD2*, экспрессия которого локализована в стриатуме, опосредует токсичность мутантного хантингтина [114]. В полученных культурах была изучена экспрессия отобранных маркеров срединных шипиковых нейронов стриатума с помощью ОТ-ПЦР. Также методом ОТ-ПЦР была продемонстрирована экспрессия генов субъединиц рецепторов глутамата *GRIA1*, *GRIA2*, *GRIK2*, *GRIK5*, *GRIN1*, *GRIN2B*, которые экспрессируются во всех типах нейронов. Уровень экспрессии маркеров срединных шипиковых нейронов стриатума был сравним с уровнем экспрессии субъединиц рецепторов глутамата (рис. 10).

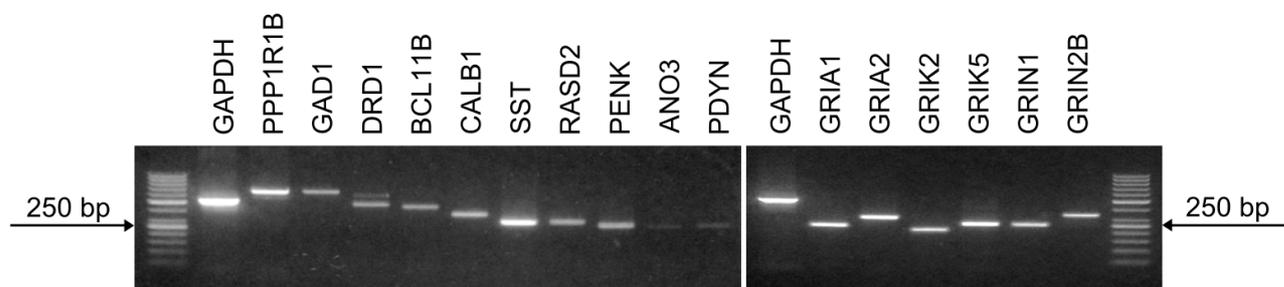


Рисунок 10. Репрезентативная электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации с кДНК дифференцированных нейронов фрагментов генов *PPP1R1B*, *GAD1*, *DRD1*, *BCL11B*, *CALB1*, *SST*, *RASD2*, *PENK*, *ANO3*, *PDYN*, *GRIA1*, *GRIA2*, *GRIK2*, *GRIK5*, *GRIN1*, и *GRIN2B*. Показан анализ линии клеток endo-iPS 12.

Одним из функциональных свойств срединных шипиковых нейронов стриатума является синтез гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [142]. Анализ культуральной среды нейрональной популяции методом ВЭЖХ показал, что культуры нейронов за 30 минут экспозиции секретируют в среду ГАМК до уровня порядка 500 мкМ. Анализ дифференцированных нейронов методом просвечивающей электронной микроскопии, проведенный совместно с Сульдиной Л.А. и Киселевой Е.В. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск), выявил в фиксированных образцах нейрональной культуры наличие шипиков и синапсов (рис. 11). Для оценки электровозбудимости дифференцированных нейронов использовали оценку реакции нейронов на калий-опосредованную деполяризацию мембраны, которую проводили совместно с Вигонтом В.А. и Казначеевой Е.В. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Методом *fura-2* имэджинга показано, что после деполяризации мембраны с использованием 130 мМ КСl, наблюдается значительный приток кальция в клетку (рис. 12). Следовательно полученная культура нейронов и функционально демонстрирует свойства срединных шипиковых нейронов стриатума.

Таким образом, в работе показано, что дифференцированные из ПСК нейроны имеют морфологические, генетические и функциональные признаки срединных шипиковых нейронов стриатума: формируют синапсы и имеют шипики, экспрессируют целый ряд характерных генов, отвечают на деполяризацию мембраны и секретируют ГАМК.

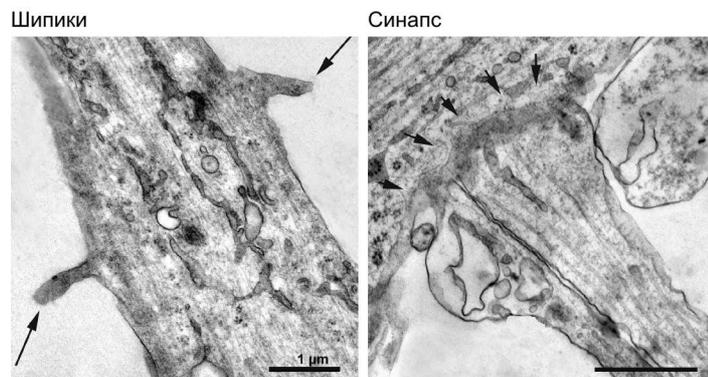


Рисунок 11. Микрофотографии дифференцированных нейронов, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. Показаны нейроны линии hESM01.

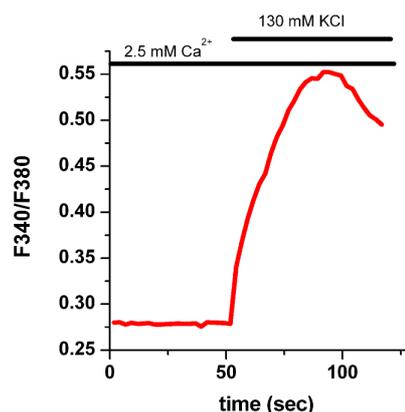


Рисунок 12. Уровень кальция в цитозоле дифференцированных нейронов в ответ на деполяризацию клеточной мембраны с помощью KCl. Уровни катионов кальция измеряли с помощью Fura-2. Горизонтальные линии на верхней части графика указывают время применения 2.5 mM Ca²⁺ или 130 mM KCl в культуральной среде. Показаны результаты, полученные для нейронов линии iPSHD22.

3.8. Проявления болезни Гентингтона в мутантных срединных шипиковых нейронах стриатума, дифференцированных из ИПСК человека *in vitro*

Одной из задач данного диссертационного исследования являлось сравнительное исследование патологических и нормальных клеток, которое должно было позволить, во-первых, обнаружить признаки проявления заболевания в *in vitro* культурах нейронов с малым количеством избыточных CAG-повторов в мутантном аллеле гена *хантингтина*; во-вторых, разработать функциональные тестовые системы *in vitro*, отражающие нейродегенерацию при болезни Гентингтона.

Чтобы выявлять различия между культурами клеток от пациентов с болезнью Гентингтона и контрольными, линии ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона (iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34) и здоровые ПСК человека (endo-iPS 12, iPSRG2L, hESM01) дифференцировали параллельно в соответствии с разработанным протоколом. Между клетками от пациентов с болезнью Гентингтона и контрольными не было замечено различий в скорости пролиферации и способности к дифференцировке на каждом из этапов протокола, а также в проценте получаемых нейронов, экспрессирующих DARPP-32. Такой результат вполне ожидаем, так как болезнь Гентингтона проявляется в позднем возрасте. Это наблюдение также согласуется с более ранним исследованием, где ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона и малым количеством избыточных CAG повторов в мутантном аллеле гена *хантингтина* не показали отличий от нормы в пролиферации и способности к дифференцировке [106]. Тем не менее, клетки с большим (180) количеством CAG повторов в мутантном аллеле гена

хантингтина демонстрировали отличия от нормы уже в процессе дифференцировки [107]. Это вполне объяснимо, так как с увеличением количества CAG повторов гене *хантингтине* снижается и возраст дебюта болезни Гентингтона, так, например, у пациента со 140 CAG повторами в гене *хантингтине* заболевание клинически диагностировали в 6 лет [143]. Также важно отметить, что исследования с использованием методов магнитной резонансной томографии и позитронно-эмиссионной томографии показали, что атрофию стриатума у пациентов можно обнаружить даже за 10 лет до дебюта заболевания [102].

Внутриклеточные включения мутантного хантингтина являются признаком болезни Гентингтона и могут быть детектированы с использованием антител EM48 против агрегированного белка [144]. Проведенный иммуноцитохимический анализ показал наличие EM48-положительных включений в 6-месячных зрелых патологических нейронах (рис. 13), но не в контрольных нейронах. Ранее было показано, что добавление ингибитора протеасом MG132 к культурам ИПСК человека от пациента с болезнью Гентингтона приводит к формированию агрегатов хантингтина [108], следовательно, применение MG132 может способствовать формированию агрегатов хантингтина и в дифференцированных нейронах. Добавление в культуральную среду ингибитора протеасомы MG132 в концентрации 10 мкМ на 24 часа значительно увеличивало число EM48-позитивных включений в культурах патологических нейронов (рис. 13), но не в культурах нормальных нейронов.

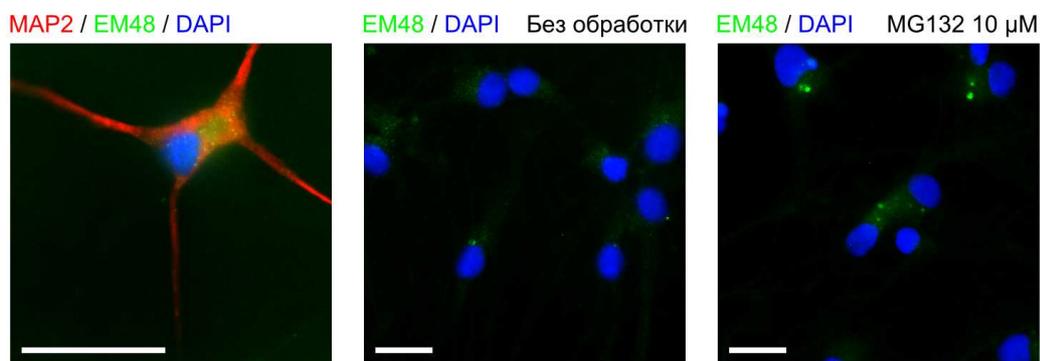


Рисунок 13. Окрашенные антителами EM48 дифференцированные нейроны, ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет), масштабная линейка 50 мкм. Показаны нейроны линии iPSHD22.

Недавно было обнаружено, что агрегированный мутантный хантингтин разрушает ядерную оболочку клетки [145]. По этой причине была исследована морфология нормальных и патологических клеток, дифференцированных в срединные шипиковые нейроны стриатума, на субклеточном уровне с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Исследование проводилось совместно с Сульдиной Л.А. и Киселевой Е.В. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Анализ результатов показал, что патологические нейроны

содержат большее число лизосом и аутофагосом, чем нормальные нейроны. В патологических нейронах также значительно чаще наблюдаются митофагия и инвагинации ядерной оболочки (рис. 14). Все эти явления ранее были замечены как проявления болезни Гентингтона у пациентов. Повышенное содержание аутофагосом/лизосом-подобных структур наблюдали на посмертном материале пациентов с болезнью Гентингтона [146,147]. Дисфункцию митохондрий при болезни Гентингтона доказывает целый ряд фактов. Это и значительная потеря массы тела и мышц пациентами с болезнью Гентингтона [148,149], и пониженный метаболизм глюкозы в мозгу пациентов с болезнью Гентингтона, выявленный методом позитронно-эмиссионной томографии [150,151], и сниженная активность дыхательной цепи переноса электронов в митохондриях, полученных из образцов мозга пациентов с болезнью Гентингтона [152]. Методом электронной микроскопии на посмертных срезах мозга пациентов с болезнью Гентингтона была обнаружена повышенная частота встречаемости инвагинаций ядерной оболочки по сравнению с образцами от здоровых пациентов [153].

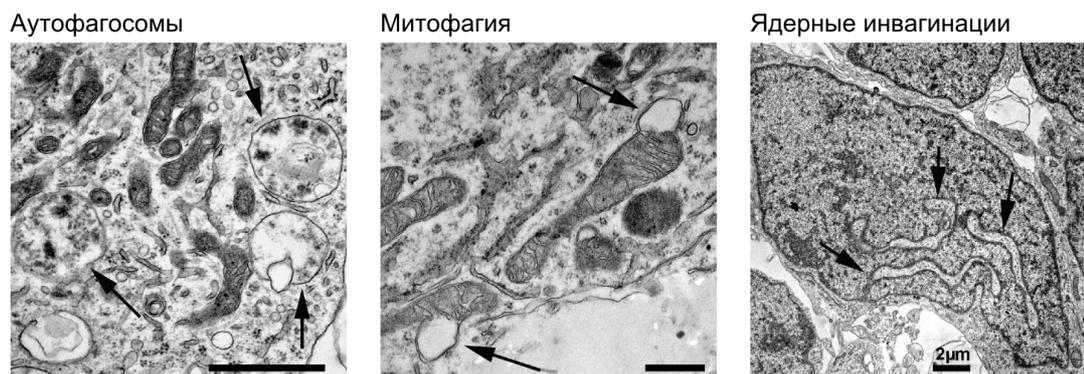


Рисунок 14. Микрофотографии патологических дифференцированных нейронов, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии.

3.9. Количественный анализ содержания лизосом в нормальных и патологических нейронах

Повышенное содержание аутофагосом/лизосом-подобных структур характерно для болезни Гентингтона, это явление наблюдали на посмертном материале человека [142,143], а также в клеточных моделях болезни Гентингтона [154]. Так как повышенное содержание лизосом было замечено при исследовании патологических нейронов методом просвечивающей электронной микроскопии, была проведена количественная оценка содержания лизосом в нормальных и патологических нейронах. Содержание лизосом в патологических и нормальных нейронах было оценено методом проточной цитометрии живых нейронов, окрашенных флуоресцентным красителем лизосом LysoTracker Green DND-26. Было обнаружено, что

патологические нейроны имеют более высокое медианное содержание лизосом по сравнению с контрольными нейронами (2203 ± 172 против 1539 ± 65 относительных единиц флуоресценции соответственно; $p < 0.05$) (рис. 15). В более ранней работе, выполненной на нейронах дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, повышенное содержание лизосом наблюдали только при стрессовом воздействии 100 мМ сахарозы на клетки в течение 48 часов [106]. Предположительно, обнаружение разницы было обусловлено тем, что в эксперименте была использована популяция нейронов, в наибольшей степени обогащенная типом клеток, подверженных патологическому процессу при болезни Гентингтона.

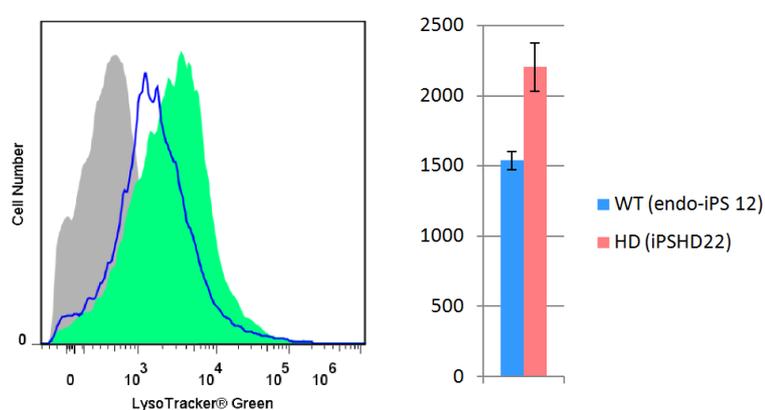


Рисунок 15. Анализ нормальных и патологических нейронов, окрашенных LysoTracker Green DND-26 методом проточной цитометрии. На диаграмме: не окрашенные нейроны (серый), окрашенные контрольные нейроны (синий), патологические окрашенные нейроны (зеленый). График демонстрирует медианную интенсивность флуоресценции по трем нормальным и трем патологическим образцам.

3.10. Количественный анализ деформации ядерной оболочки внутри клеточного ядра (инвагинация) в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и контрольной группы

Инвагинации оболочки клеточного ядра были заметны не только на электронно-микроскопических снимках (рис. 14), но и на микрофотографиях клеточных ядер, окрашенных DAPI (рис. 16). Для количественной оценки инвагинаций ядерной оболочки был использован метод ядерной морфометрии. Этот метод успешно используется в научных исследованиях и диагностике различных патологий человека [88,155]. Метод основан на измерении по микрофотографиям клеток, окрашенных DAPI или другим красителем, безразмерного коэффициента округлости, который вычисляют как отношение квадрата периметра клеточного

ядра к его площади. Чем больше значение коэффициента округлости тем сильнее искривлено клеточное ядро. Среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра в патологических нейронах было значительно повышено и составляло $116 \pm 3\%$, $118 \pm 3\%$, и $133 \pm 4\%$ для iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 линий соответственно, в среднем $122 \pm 3\%$, в то время как в контрольных нейронах среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра составляло $95 \pm 2\%$, $104 \pm 3\%$, и $101 \pm 3\%$ для endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 линий соответственно, в среднем $100 \pm 3\%$ ($p < 0.05$) (рис. 16). Сравнение патологических и контрольных недифференцированных линий ИПСК не выявило существенных различий в среднем значении коэффициента округлости клеточного ядра, следовательно, можно предположить, что данное проявление болезни Гентингтона возможно, является специфичным для нейронов.

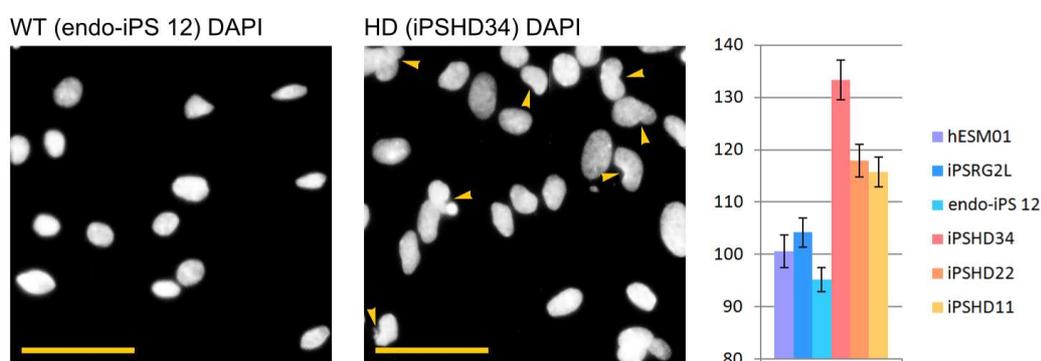


Рисунок 16. Окрашенные DAPI патологические и нормальные нейроны. Патологические нейроны демонстрируют инвагинации ядерной оболочки. Масштабная линейка 50 мкм. На графике представлено среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра для нейронов, дифференцированных из патологических и нормальных линий ИПСК.

Чтобы глобально оценить состояние ядерной оболочки, было исследовано распределение ламина А, который обеспечивает механическую прочность оболочки, и ламина В1, который поддерживает целостность ядерной оболочки в клетках [156]. Исследование было проведено методом иммуногистохимии. Отклонений от нормы в распределении ламинов у нейронов, имеющих мутацию в гене *HTT* обнаружить не удалось (рис. 17).

В данном диссертационном исследовании впервые описан повышенный уровень инвагинаций ядерной оболочки в патологических нейронах, дифференцированных *in vitro* из ИПСК полученных от пациентов с болезнью Гентингтона. Важно отметить, что инвагинации ядерной оболочки ранее наблюдали в посмертных срезах мозга пациентов с болезнью Гентингтона [153]. Хотя молекулярные механизмы, ответственные за это явление, до сих пор остаются не изученными, ядерная морфометрия ясно указывает на патологический фенотип,

который может быть использован для выполнения простых и масштабируемых тестов с целью поиска потенциальных лекарств от болезни Гентингтона.

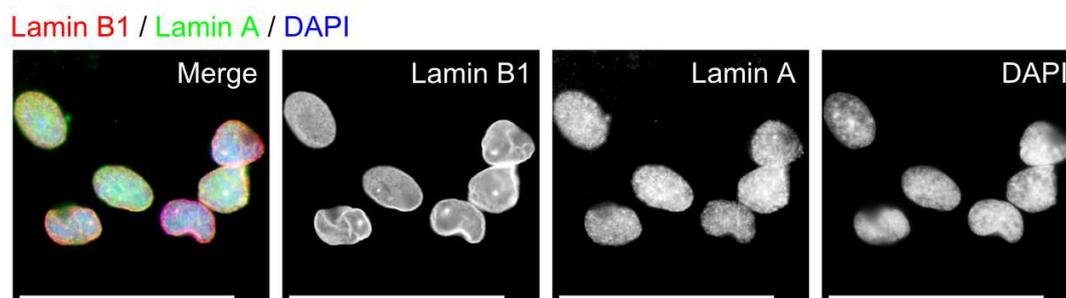


Рисунок 17. Патологические нейроны, окрашенные антителами к Ламину А, Ламину В1 и DAPI. Масштабная линейка 50 мкм.

3.11. Исследование природы инвагинаций ядерной оболочки

Далее была исследована природа инвагинаций ядерной оболочки с использованием воздействия химических веществ на клетки. Ранее было показано, что под действием MG132, который является активатором проапоптотического сигнала от JNK1, значительно уменьшается выживаемость нейронов стриатума крысы с повышенной экспрессией мутантного хантингтина. Однако, при воздействии на нормальные нейроны крысы такого эффекта не наблюдалось [157]. В проведенных экспериментах инкубация нейронов с 10 мкМ MG132 в течение 24 часов значительно повышала среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра в патологических нейронах, но не в контрольных нейронах, средние значения коэффициента округлости клеточного ядра после инкубации составили $123 \pm 3\%$, $172 \pm 4\%$, и $155 \pm 6\%$ для линий iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 соответственно, в среднем = $150 \pm 4\%$ ($p < 0.05$ по сравнению с не обработанными MG132 нейронами) (рис. 18). Таким образом, как и в случае трансгенной модели и экспериментов *in vitro*, MG132 селективно действует именно на патологические нейроны. LiCl был недавно предложен в качестве возможного лекарства от болезни Гентингтона благодаря его способности снижать гибель нейронов в модели глутамат-индуцированного апоптоза и индуцировать аутофагию [158]. Воздействие 8 мМ LiCl в течение 24 часов на нейроны, полученные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, было аналогично действию MG132 и усиливало патологический фенотип только в мутантных нейронах. Среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра в патологических нейронах составляло $127 \pm 3\%$, $126 \pm 3\%$, и $163 \pm 5\%$ для iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 линий соответственно, в среднем = $139 \pm 4\%$ ($p < 0.05$ по сравнению с не обработанными LiCl нейронами) (рис. 18). Таким образом, можно предположить, что даже усиленный клиренс

мутантного хантингина, который, как предполагается, увеличивается за счет активизации аутофагии под воздействием хлористого лития, не может предотвратить повышенной частоты формирования инвагинаций ядерной оболочки. Неправильный фолдинг белков является общим признаком для ряда нейродегенеративных патологий. Предполагается, что похожие механизмы могут быть вовлечены в патологические процессы. Недавно было опубликовано исследование, в котором показали, что ингибитор фосфоинозитид 3-киназы (PI3K) LY294002, действуя по неизвестному механизму, исправлял похожие изменения в морфологии клеточного ядра в нейрональных предшественниках, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих мутацию в гене *LRK2* [88]. Хотя LY294002 еще не является средством терапии при болезни Паркинсона, было решено исследовать «терапевтическое» свойство этой малой молекулы в отношении коррекции морфологии ядра в нейронах при болезни Гентингтона. Было обнаружено, что LY294002 за 24 часа в концентрации 25 мкМ значительно уменьшал среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра в патологических нейронах до $94 \pm 2\%$, $102 \pm 2\%$, и $87 \pm 3\%$ для iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 линий соответственно, в среднем = $94 \pm 2\%$ ($p < 0.005$ по сравнению с не обработанными LY294002 нейронами). Однако, действие LY294002 оказалось не специфичным потому что обработанные LY294002 контрольные нейроны также показали значительное снижение среднего значения коэффициента округлости клеточного ядра с наблюдаемыми значениями после инкубации $82 \pm 2\%$, $68 \pm 8\%$, и $71 \pm 3\%$ для endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 линий, в среднем = $74 \pm 5\%$ ($p < 0.005$ по сравнению с не обработанными LY294002 нейронами) (рис. 18). Хотя PI3K сигналинг вовлечен в организацию клеточного ядра, этот каскад, по-видимому, не нарушается экспрессией мутантного хантингина при болезни Гентингтона. Таким образом, действие малой молекулы, скорее всего, не связано с мутациями, определяющими болезнь или агрегацию белков.

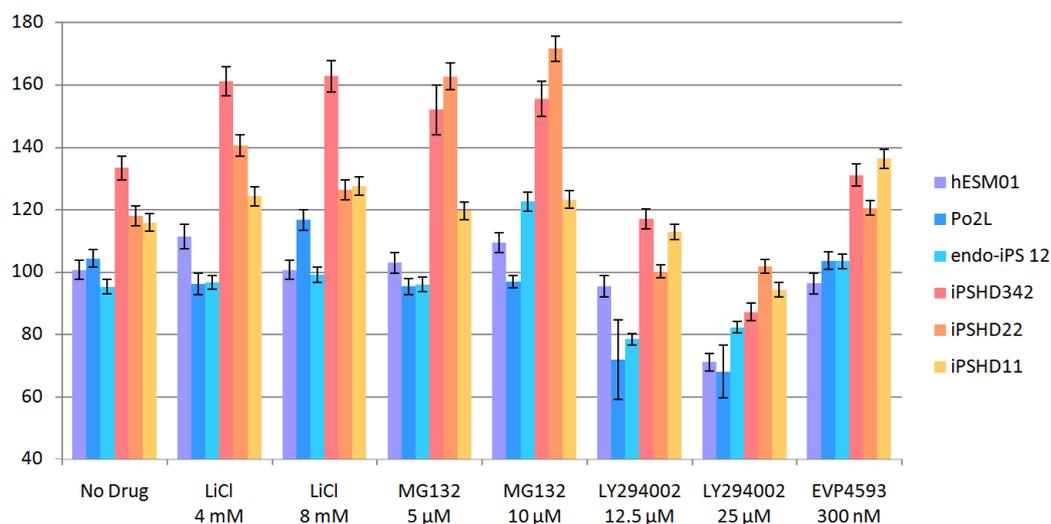


Рисунок 18. Среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра нейронов, дифференцированных из патологических и нормальных линий ПСК после обработки в течение 24 часов различными химическими агентами.

3.12. Транскриптомный анализ дифференцированных *in vitro* нейронов человека, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и контрольных ПСК

Архитектура клеточного ядра важна для клеточных функций, непосредственно связанных с клеточной специализацией и сигналингом [159]. Следовательно, глобальные изменения в структуре ядра должны быть отражены в экспрессии генов, по этой причине поиск различий в экспрессии генов между патологическими и контрольными нейронами является обоснованным. Было произведено полнотранскриптомное профилирование трех образцов патологических и трех образцов контрольных культур клеток, дифференцированным *in vitro* в направлении срединных шипиковых нейронов стриатума. Сравнительный анализ выявил, что в патологических нейронах экспрессия 183 генов повышена, а экспрессия 52 генов снижена ($\text{DiffScore} > 25$, $p < 0.05$), список этих генов представлен в таблице 4. Среди выявленных генов есть гены, описанные ранее, как вносящие вклад в патологию болезни Гентингтона. Например, в нашей модельной системе нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, показали повышенную экспрессию гена *IFT57*, который вызывает НР1 опосредованную гибель нейронов действуя, вероятно, через активацию каспазы-8 комплексом НР1-IFT57 [160], ген *ARHGEF6* повышает агрегацию мутантного хантингина [161], а экспрессия гена *IRS2* необходима для клиренса мутантного хантингина [162]. Более того, в культурах клеток, дифференцированных *in vitro*, была повышена экспрессия генов *TIMP1* и *IER3*, которые были недавно предложены в качестве биомаркеров болезни Гентингтона [163,164]. Для выявления молекулярных функций, к которым относятся гены, экспрессия

которых была повышена в мутантных нейронах, был проведен анализ по обогащению с помощью веб-приложения GOrilla [117] (рис. 19). Оказалось, что большинство выявленных генов участвуют в связывании ионов кальция и кальциевой сигнализации, что согласуется с другими данными по анализу экспрессии генов в нейрональных клетках, имеющих мутацию в гене *хатингтине* [107,165]. О нарушениях в транспорте кальция при болезни Гентингтона было известно и раньше. В частности, было обнаружено, что депо-управляемый вход кальция повышен в трансгенных моделях болезни Гентингтона с большим количеством CAG повторов в гене *хантингтине* [7]. Хотя основным местом хранения кальция в клетке являются эндоплазматический ретикулум и митохондрии, лизосомы, содержание которых повышено в патологических нейронах, также имеют функцию хранения ионов кальция, а лизосомальный кальций может быть высвобожден через каналы семейства TRPC [166].

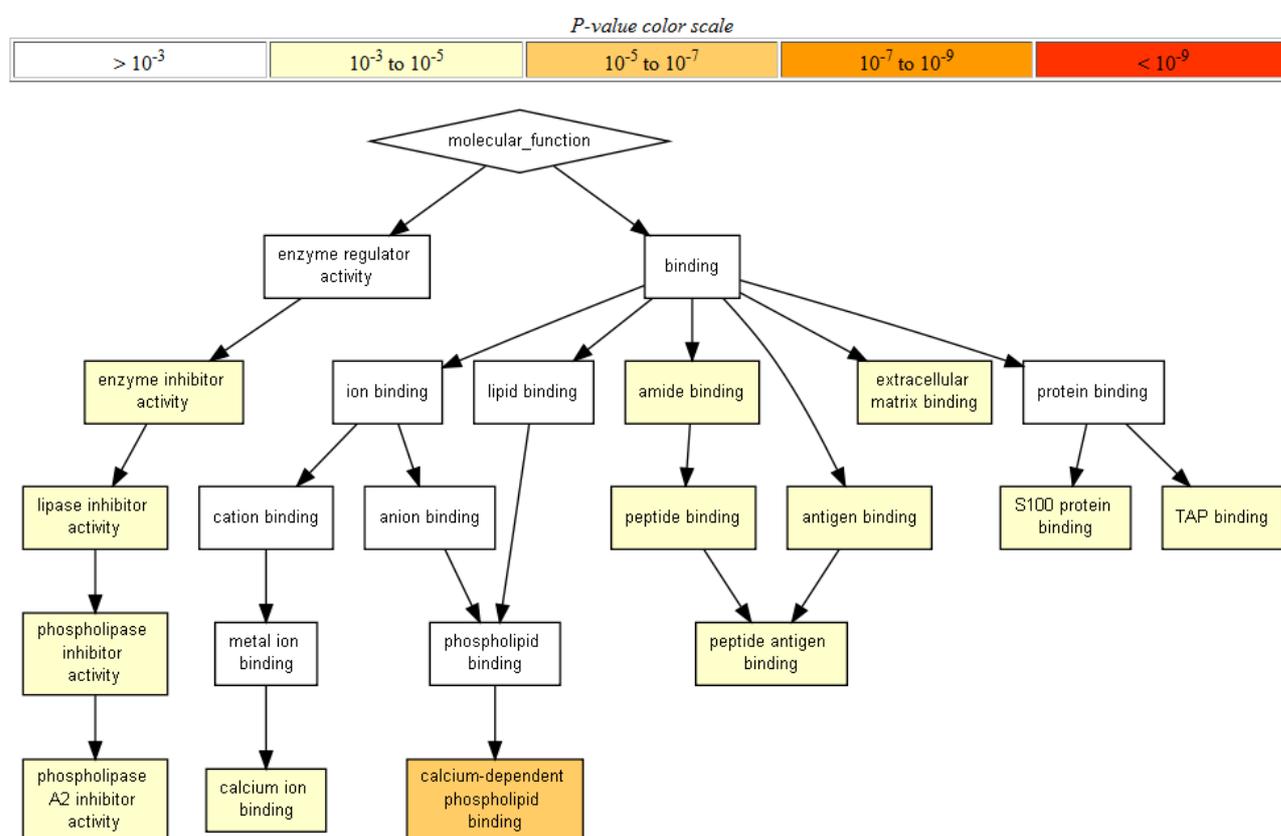


Рисунок 19. Классификация генов, которые экспрессируются на более высоком уровне в патологических нейронах, по молекулярной функции с использованием биоинформатического инструмента GOrilla.

Таблица 4. Гены, продемонстрировавшие дифференциальную экспрессию между патологическими и нормальными нейронами.

Название гена (изменение экспрессии в патологии относительно нормы, разы)
S100A6 (5.0), MT1F (4.1), PCSK1 (3.9), MT1A (3.9), CYBRD1 (3.8), CA12 (3.5), MT1X (3.5), MT2A (3.4), LOC100134073 (3.4), LGALS1 (3.4), SPARCL1 (3.3), ARHGEF6 (3.1), EMP1 (3.0), GAD1 (3.0), IGFBP7 (2.9), HLA-A29.1 (2.9), FLJ14213 (2.8), VAMP5 (2.8), FLJ10916 (2.8), ANXA2P1 (2.8), PCP4 (2.7), MX1 (2.7), OLFML2A (2.7), ANXA1 (2.6), MBIP (2.6), MAOA (2.6), LIMA1 (2.6), LOC647307 (2.6), SOX8 (2.5), ANGPTL4 (2.5), SERPINH1 (2.5), LOC730278 (2.5), TAP1 (2.4), NQO1 (2.4), B2M (2.4), FHL1 (2.4), METTL7A (2.4), PALLD (2.3), ANXA2 (2.3), RGS2 (2.3), MYH9 (2.3), OCIAD2 (2.3), ITPRIP (2.3), PNPO (2.3), RGL1 (2.3), COL4A1 (2.3), LYPD1 (2.3), MTMR11 (2.2), CHURC1 (2.2), EPHB1 (2.2), KIAA0182 (2.2), TIMP1 (2.2), NFE2L2 (2.2), LIPG (2.2), CHST15 (2.1), MBNL2 (2.1), HLA-H (2.1), SLC2A12 (2.1), DLK1 (2.1), VASN (2.1), GJA1 (2.1), STOM (2.1), FABP5 (2.1), PDGFRB (2.1), FNDC3B (2.1), ELK1 (2.1), CXorf57 (2.1), FOXO1 (2.1), SCG5 (2.1), ARHGEF3 (2.1), GATM (2.1), CADM1 (2.1), TIPARP (2.1), CREG1 (2.1), SH3BP4 (2.0), ZBTB20 (2.0), S100A11 (2.0), TSPAN9 (2.0), HLA-G (2.0), SPARC (2.0), COL4A5 (2.0), TPM2 (2.0), PHF11 (2.0), FCGRT (2.0), LAMC1 (2.0), NPAL3 (1.9), TPP1 (1.9), MED14 (1.9), MGST1 (1.9), ALDH3A2 (1.9), HLA-F (1.9), HLA-A (1.9), CANX (1.9), C5orf32 (1.9), IFI27L2 (1.9), KLHL13 (1.9), HSD17B10 (1.9), VAMP3 (1.9), ASAP1 (1.9), RHOB (1.9), CCDC28A (1.9), FABP5L2 (1.9), ARMCX3 (1.9), SLC9A3R1 (1.8), HDAC4 (1.8), FERMT2 (1.8), OLIG1 (1.8), SPIRE1 (1.8), LAMA5 (1.8), SPOCK2 (1.8), FGFR1 (1.8), C17orf79 (1.8), CMPK1 (1.8), PROS1 (1.8), SPATS2L (1.8), PLOD3 (1.8), LOC100134361 (1.8), PLOD2 (1.8), LHFP (1.8), FAM190B (1.7), TACC1 (1.7), DSTN (1.7), IER3 (1.7), MID1IP1 (1.7), TMEM47 (1.7), IFT57 (1.7), STAG2 (1.7), ACTN1 (1.7), TSKU (1.7), GPRASP2 (1.7), MAPK4 (1.7), FAM127C (1.7), SQSTM1 (1.7), LOC641768 (1.7), WDR1 (1.7), TSPAN7 (1.7), TYK2 (1.7), SLC2A10 (1.7), MGMT (1.7), ACPL2 (1.6), IRS2 (1.6), SELM (1.6), C11orf46 (1.6), LAMP2 (1.6), FAM120A (1.6), KIAA0494 (1.6), PHYH (1.6), EFR3A (1.6), C11orf67 (1.6), DPY19L1 (1.6), TMEM43 (1.6), SIDT2 (1.6), OLIG2 (1.6), CPNE3 (1.6), MXRA7 (1.5), PPP1R3C (1.5), LMNA (1.5), ZSCAN18 (1.5), TMEM50B (1.5), SSR1 (1.5), IFI27L1 (1.5), ANXA7 (1.5), C1orf93 (1.5), ELOVL5 (1.5), RIPK5 (1.5), EPDR1 (1.5), GLCE (1.5), HSD17B12 (1.5), RBM23 (1.5), PURB (1.5), TCEAL4 (1.5), CAPZA2 (1.4), RBL2 (1.4), ZFAND6 (1.4), KBTBD2 (1.4), COX17 (1.4), RAB5B (1.4), ANXA5 (1.4), DYRK4 (1.3), LANCL1 (1.3), CCND3 (1.3), ZMAT3 (1.2), TMSB4X (1.1), LOC647000 (0.9), U2AF1 (0.9), RPL9 (0.9), LOC729679 (0.9), BTBD17 (0.9), TUBB3 (0.9), C16orf48 (0.9), EVL (0.8), HNRNPAB (0.8), MAP6 (0.8), WDR68 (0.8), TUBB2A (0.8), LOC347544 (0.8), SMA4 (0.8), LOC388556 (0.8), FLJ25404 (0.8), CCDC23 (0.8), TUBB (0.8),

H2AFY2 (0.8), ELAVL4 (0.8), DNLZ (0.8), ELAVL3 (0.7), SALL2 (0.7), RNASEH2A (0.7), LOC644919 (0.7), LOC650757 (0.7), STMN2 (0.7), PGRMC1 (0.7), TUBB4Q (0.7), GPC2 (0.7), TUBB4 (0.7), RPL39L (0.7), CPXM1 (0.7), MDK (0.7), ABLIM1 (0.7), CENPV (0.6), LOC653344 (0.6), C8orf13 (0.6), LOC92755 (0.6), FLJ22795 (0.6), NELL2 (0.6), LRRN1 (0.6), ASNS (0.6), AUTS2 (0.5), SIPA1L2 (0.5), REM2 (0.5), MGC61598 (0.5), NR2F2 (0.4), KLHL35 (0.4), NR2F1 (0.3), ZIC2 (0.3), NEFM (0.2).

3.13. Депо-управляемый вход кальция в нормальных и патологических нейронах

Повышенное содержание ионов кальция в цитозоле является токсичным для нейронов и может быть одной из основных молекулярных причин гибели нейронов при болезни Гентингтона [167,168]. Одним из нарушений, которое наблюдали в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, трансфицированных конструкцией, содержащей ген *хантингтин* с 138 CAG-повторами, а также в нейронах стриатума трансгенной мыши YAC128, является повышенный депо-управляемый вход кальция в клетки [7,169]. По этой причине были проведены исследования по депо-управляемому транспорту ионов кальция в нормальных и мутантных нейронах дифференцированных из ПСК. Исследования проводились совместно с Вигонтом В.А. и Казначеевой Е.В. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Для измерения депо-управляемых кальциевых токов использовали метод patch-clamp в конфигурации whole cell. Депо-управляемый вход кальция а клетку индуцировали с использованием 1 мкМ тапсигаргина во внешнем растворе. В результате исследования оказалось, что полностью развившиеся тапсигаргин-индуцированные токи в патологических нейронах из iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 составляли 3.93 ± 0.19 , 3.74 ± 0.27 , и 4.88 ± 0.70 пА/пФ соответственно, в то время как тапсигаргин-индуцированные токи в нормальных нейронах из iPSRG2L, endo-iPS 12 и hESM01 составляли 1.86 ± 0.26 , 2.27 ± 0.22 и 2.07 ± 0.22 пА/пФ соответственно (рис. 20А-Г). В среднем полностью развившиеся тапсигаргин-индуцированные токи в патологических нейронах составляли 4.10 ± 0.25 пА/пФ, а в нейронах дикого типа 2.07 ± 0.22 пА/пФ (рис. 20Д). Таким образом, депо-управляемые кальциевые токи были примерно в 2 раза выше в нейронах, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Особо следует отметить высокую воспроизводимость данных, полученных на генетически разных, но функционально однородных популяциях нейронов. Высокая воспроизводимость результатов свидетельствует о том, что полученные линии клеток и разработанные методики по их культивированию *in vitro* являются стандартизованными и могут быть использованы для любых аналогичных исследований, в том числе и методами высокопродуктивного скрининга.

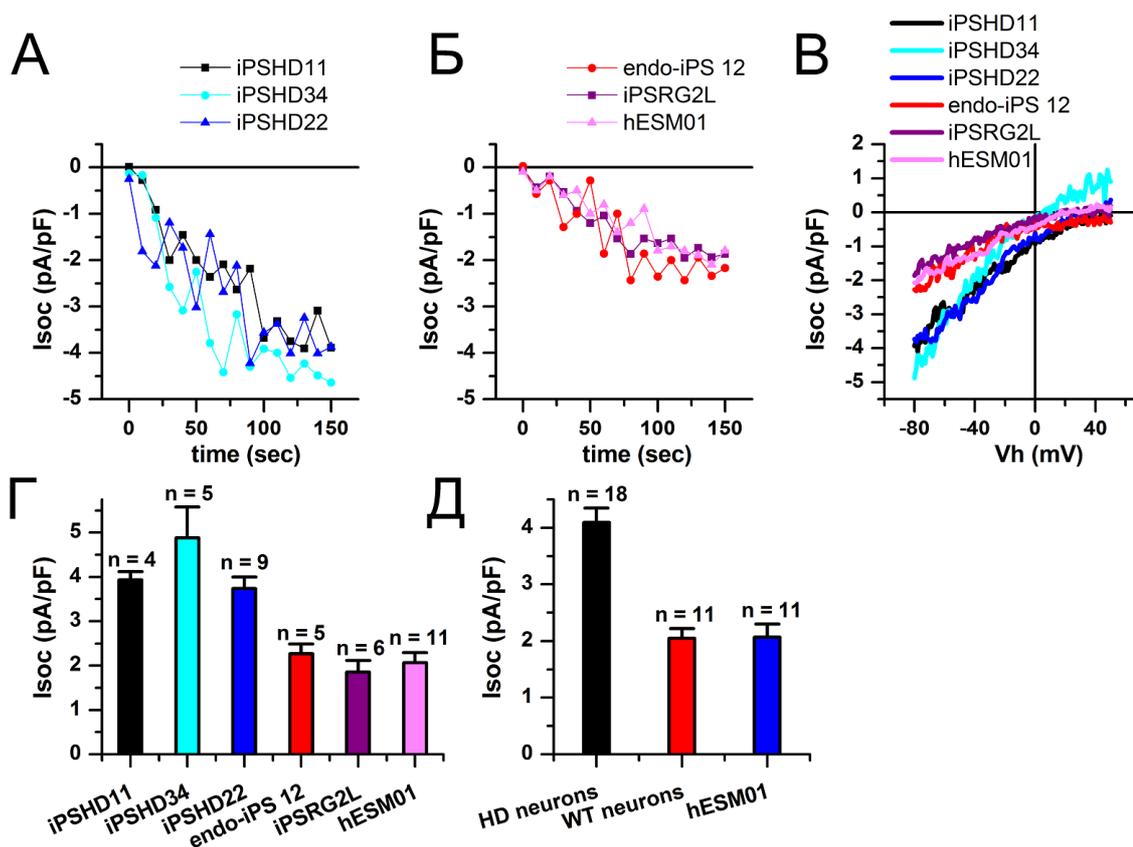


Рисунок 20. (А, Б) – Амплитуды депо-управляемых токов после добавления тапсигаргина в концентрации 1 мкМ, записанные как функция времени (А) – Патологические нейроны, дифференцированные из линий iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34. (Б) – Контрольные нейроны, дифференцированные из линий iPSRG2L, endo-iPS 12 и hESM01. Амплитуды токов для всех групп измеряли каждые 10 секунд при -80 мВ тестового потенциала. Каждый график показывает результаты одного репрезентативного эксперимента. (В) – Усредненная вольт-амперная характеристика токов, вызываемых пассивным истощением кальция в депо с помощью 1 мкМ тапсигаргина в нейронах, дифференцированных из патологических и контрольных линий ПСК. Вольт-амперные характеристики были записаны после полного развития депо-управляемых токов. Каждая кривая представляет собой среднее из нескольких экспериментов. (Г) – Средняя амплитуда депо-управляемых токов в каждой линии клеток. (Д) – Средняя амплитуда депо-управляемых токов в нормальных и патологических нейронах в среднем. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (n - число опытов).

Ранее, используя линии *Drosophila melanogaster*, трансгенных по N-концевому фрагменту гена хантингтина человека со 128 CAG-повторами, как систему скрининга химических субстанций, было идентифицировано производное хиназолинового ряда EVP4593 [7]. Исследования EVP4593 позволили установить, что это вещество снижает депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, трансфицированных

хантингтином с 138 CAG-повторами, а также в нейронах стриатума трансгенной мыши YAC128 [7]. Для определения терапевтической перспективности EVP4593 было проведено исследование воздействия малой молекулы на нейроны, дифференцированные из ПСК человека. В результате электрофизиологических измерений установлено, что после полного развития депо-управляемых токов, вызванных воздействием 1 мкМ тапсигаргина, добавление нейронам во внешний раствор 3 мкМ EVP4593 приводило к снижению тапсигаргин-индуцированных токов в патологических нейронах с 4.10 ± 0.25 до 1.07 ± 0.37 пА/пФ, а для нейронов дикого типа снижение тапсигаргин-индуцированных токов происходило с 2.05 ± 0.18 до 0.86 ± 0.15 пА/пФ (рис. 21А-Г). Применение EVP4593 в концентрации 100 нМ демонстрировало аналогичное снижение депо-управляемого входа кальция в клетки.

Таким образом, описанные выше эксперименты показали наличие значительных нарушений транспорта кальция через плазматическую мембрану в мутантных нейронах. Несмотря на использование нейронов человека с геном *HTT*, несущим значительно меньшее количество CAG-повторов (40-47), нарушение депо-управляемого входа ионов кальция в мутантных нейронах четко проявляется и соответствует ранее наблюдаемым на модельных объектах повышению примерно в 2 раза. Используемая электрофизиологическая методика позволяет оценить депо-управляемые токи ионов кальция лишь в очень небольшом количестве клеток. Описанные характеристики депо-управляемых токов ионов кальция позволяют четко разделить нейроны по наличию мутации в гене *хантингтине* несмотря на то, что нейроны были дифференцированы из ПСК, полученных с помощью различных подходов и от разных пациентов. Это указывает на обоснованность и воспроизводимость такого метода моделирования болезни Гентингтона. Интересно, что EVP4593 снижает депо-управляемые токи ионов кальция как в патологических, так и в контрольных нейронах до значения в два раза ниже нормы. Снижение концентрации EVP4593 в 30 раз с 3 мкМ до 100 нМ не приводило к изменению эффекта EVP4593, откуда следует, что основная масса экспериментов с 3 мкМ EVP4593 была выполнена в режиме полного насыщения. Отсюда можно предположить, что депо-управляемый вход кальция в нейроны управляется двумя независимыми процессами с примерно равным вкладом в норму; один из этих процессов сенсебилизируется мутантным хантингтином и ингибируется EVP4593, другой не зависит ни от EVP4593, ни от мутантного хантингтина. Механизмы действия EVP4593 обсуждаются далее.

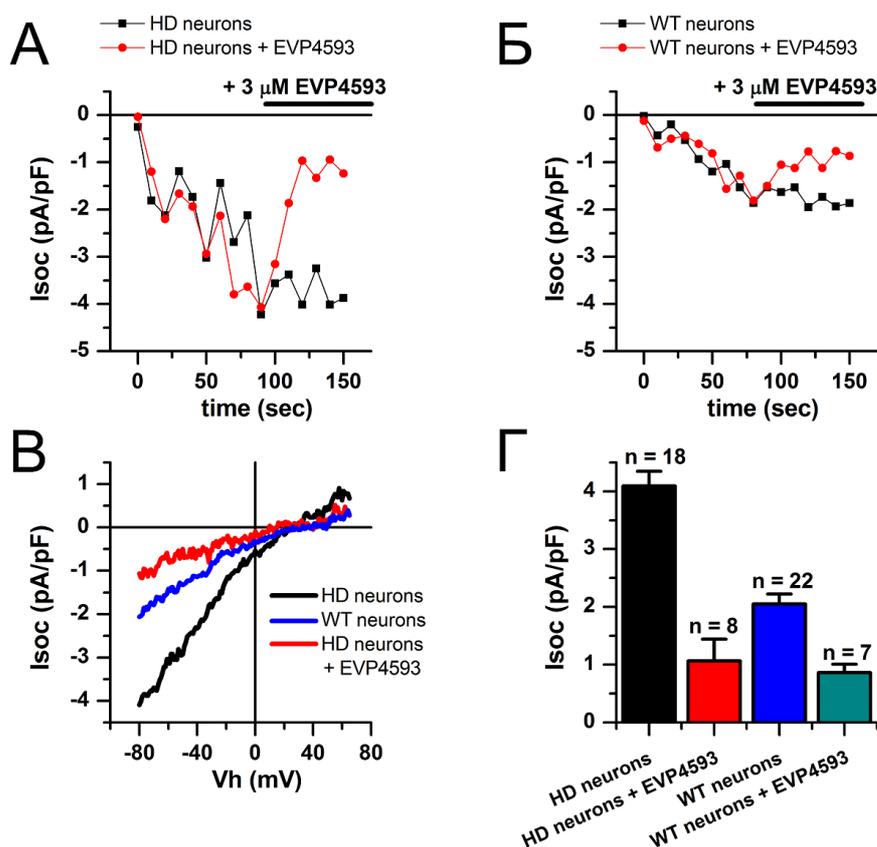


Рисунок 21. (А, Б) – Амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов. (А) – Патологические нейроны с и без добавления EVP4593 3 мкМ. (Б) – Контрольные нейроны с и без добавления EVP4593 3 мкМ. Точка 0 секунд соответствует моменту добавления тапсигаргина. Амплитуды депо-управляемых токов были измерены при тестовом потенциале -80 мВ. Время применения EVP4593 показано на рисунке над графиком. Каждый график показывает результаты одного репрезентативного эксперимента. (В) – Усредненная вольт-амперная характеристика токов, вызываемых пассивным истощением кальция в депо с помощью 1 мкМ тапсигаргина в патологических нейронах после того, как ток достиг максимального (черная линия) и после применения EVP4593 3 мкМ (красная линия), а также в контрольных нейронах после того, как ток достиг максимального значения (синяя линия). Каждая кривая представляет собой среднее из нескольких экспериментов. (Г) – Средняя амплитуда депо-управляемых токов в патологических нейронах с (красный) и без (черный) применения 3 мкМ EVP4593, в нейронах дикого типа с (зеленый) и без (синий) применения 3 мкМ EVP4593. Для всех групп клеток амплитуду тока определяли при -80 мВ тестового потенциала. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (n - число опытов).

3.14. Изучение действия потенциального лекарства от болезни Гентингтона EVP4593 на фенотипические проявления болезни в нейронах, дифференцированных из ИПСК

Нормализация транспорта кальция в нейронах в ответ на EVP4593, вероятно, может приводить к снижению других патологических проявлений в нейронах, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, поэтому в рамках настоящей работы было исследовано действие EVP4593 на обнаруженные в данной работе фенотипические проявления заболевания. Во-первых, было проанализировано влияние EVP4593 на ядерные инвагинации. Инкубация нейронов с 300 нМ EVP4593 в течение 24 часов не оказывала значительного влияния на ядерные инвагинации ни в норме, ни в патологии (рис. 18). Во-вторых, было проанализировано количество лизосом/аутофагосом в патологических и нормальных нейронах под действием EVP4593, с помощью просвечивающей электронной микроскопии совместно с Сульдиной Л.А. и Киселевой Е.В. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Для этого проанализировали аутофагию на фотографиях нейронов из iPSHD22 и hESM01, инкубированных с 1 мкМ EVP4593 в течение 14 часов до фиксации и без добавления действующего вещества. В клетках, содержащих ядра и целостностную плазматическую мембрану, были посчитаны вакуоли на 1 мкм^2 в цитоплазме клеток с использованием программы ImageJ. Было обнаружено, что при инкубации с 1 мкМ EVP4593 14 часов уменьшается количество аутофагосом в патологических нейронах почти в два раза: с 0.41 ± 0.04 до 0.23 ± 0.04 частиц на мкм^2 ($p < 0.05$), в то время как в контрольных нейронах содержание аутофагосом не изменяется (рис. 22А). Это явление было также зарегистрировано с использованием проточной цитометрии, медианная интенсивность флуоресценции сократилась на $34 \pm 6\%$ в патологических нейронах в ответ на 100 нМ EVP4593 в течение 24 часов перед измерением ($p < 0.05$) (рис. 22Б). Тот факт, что EVP4593 нормализует содержание лизосомальных/аутофагосомальных частиц в человеческих нейронах, подобных срединным шипиковым нейронам стриатума, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона позволяет предположить, что наблюдаемые нарушения в лизосомальных/аутофагосомальных системах возможно, опосредованы нарушением гомеостаза кальция в клетке.

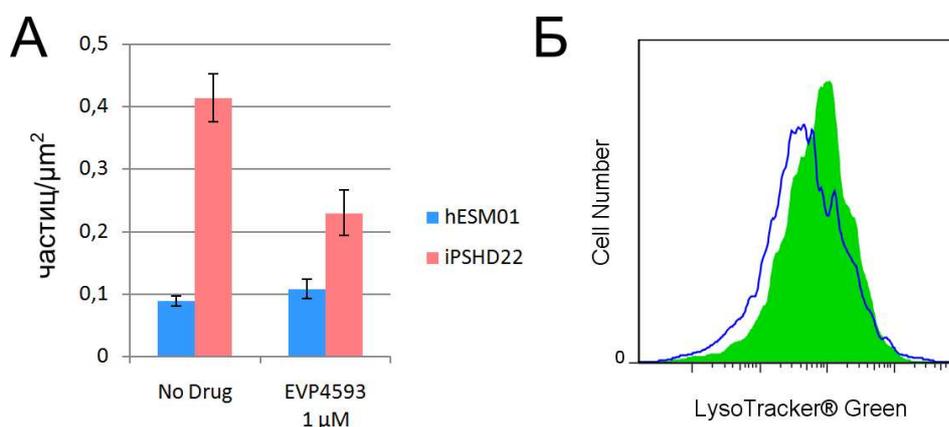


Рисунок 22. (А) – Анализ нормальных и патологических нейронов после 14 часовой обработки 1 мкМ EVP4593 и без обработки методом просвечивающей электронной микроскопии количества аутофагосом/лизосом на $\mu\text{м}^2$ площади среза. (Б) – Анализ методом проточной цитометрии окрашенных LysoTracker Green DND-26 патологических нейронов, обработанных 24 часа 100 нМ EVP4593 и без обработки. На диаграмме: не обработанные нейроны (зеленый) и обработанные 24 часа 100 нМ EVP4593 (синий).

3.15. Моделирование старения нейронов

Поскольку болезнь Гентингтона проявляется в позднем возрасте, то старение нейронов на молекулярном уровне, возможно, может быть вовлечено в процесс гибели мутантных срединных шипиковых нейронов стриатума. Культивирование дифференцированных *in vitro* нейронов происходило в лабораторных условиях на протяжении двух-шести месяцев и никаких существенных различий между контрольными и мутантными нейрональными культурами обнаружено не было. Не исключено, что за этот период не происходило существенных изменений на молекулярном уровне, которые приводят к развитию фенотипа, наблюдаемому *in vivo*, а именно, нейродегенерации. Нарушение функции протеасом плотно коррелирует с возрастом как в естественных условиях, так и *in vitro*. Вызванные снижением эффективности работы протеасомной системы изменения белкового гомеостаза клетки гипотетически лежат в основе возрастных болезней человека [170]. Протеасомная деградация белков – это основная система протеолиза в клетках млекопитающих, выполняющая нормальную деградацию белка, а также деградацию аномальных белков, которые имеют тенденцию накапливаться при старении. Таким образом, снижение протеасомной активности нейронов может ускорить их старение *in vitro* и обеспечить проявление фенотипа, наблюдаемого *in vivo*. Для ингибирования протеасомной системы использовали пептидный протеасомный ингибитор MG132, который ранее также применялся для моделирования старения нейронов [171]. Уровень клеточной смерти (LoCD) в культурах клеток измеряли с использованием MultiTox-Fluor Multiplex

Cytotoxicity Assay, принцип работы которого заключается в следующем: клеткам добавляют не способный проходить через клеточные мембраны субстрат трипептидил пептидазы II bis-AAF-R110, при расщеплении которого образуется флуоресцентный продукт, таким образом, флуоресценция позволяет оценить количество клеток, у которых нарушена целостность мембраны. Одновременно добавляют и способный проходить через клеточные мембраны субстрат катепсина С GF-AFC, при расщеплении которого образуется другой флуоресцентный продукт, что позволяет оценить общее количество клеток. Отношение флуоресценции продуктов расщепления субстратов позволяет оценить LoCD, биологический смысл которого – это доля клеток с нарушенной целостностью мембраны. Культуры дифференцированных нормальных и мутантных нейронов обрабатывали 10 мкМ MG132 в течение 24 часов для моделирования старения, после чего измеряли LoCD. Было обнаружено, что обработанные 10 мкМ MG132 в течение 24 часов культуры патологических нейронов содержат больше мертвых клеток, в среднем $LoCD = 195 \pm 34\%$, чем культуры нейронов дикого типа, обработанные MG132, в среднем $LoCD = 100 \pm 9\%$ ($p < 0.01$) (рис. 23A). Существуют и другие подходы к моделированию старения нейронов *in vitro*. Широко используемой альтернативой воздействию на протеасомную систему клетки, является окислительный стресс [172]. Миллер и коллеги недавно предложили новый интересный подход к моделированию старения нейронов. Они оверэкспрессировали белок прогерин в нейронах, дифференцированных из контрольных ИПСК и от пациентов с болезнью Паркинсона. В результате было обнаружено, что оверэкспрессия прогерина приводит к нарушениям в функционировании митохондрий, что проявляется в значительном повышении уровня активных форм кислорода, а также появлению достоверной разницы между нормальными и патологическими нейронами в длине дендритов и доли гибнущих клеток [173]. Однако для моделирования старения при болезни Гентингтона снижение протеасомной активности выглядит наиболее адекватным подходом, так как токсическое действие мутантного хантингина является зависимым от степени экспансии повторов и количества мутантного белка, который может накапливаться в клетках с возрастом.

3.16. Изучение действия потенциальных лекарств от болезни Гентингтона на модели стареющих нейронов

В описанной в данной диссертационной работе модели болезни Гентингтона, а также другими исследователями в модели болезни Паркинсона [88] было показано что LY294002 снижает инвагинацию ядерной оболочки в мутантных нейронах, в то время как EVP4593 нормализует депо управляемый вход кальция и снижает содержание лизосом/аутофагосом в патологических нейронах. В связи с этим была исследована способность химических веществ

LY294002 и EVP4593 «спасать» нейроны от MG132-индуцированной нейротоксичности, которая моделирует старение нейронов. Для этого нормальные и патологические нейроны обрабатывали 10 мкМ MG132 и исследуемым веществом одновременно, только 10 мкМ MG132, только исследуемым веществом, и без обработки. LoCD измеряли в каждом случае, и определяли дифференциальное действие указанных потенциальных лекарственных средств в предотвращении MG132-индуцированной гибели нейронов. Только EVP4593 продемонстрировал значительное и дозозависимое уменьшение MG132-индуцированной гибели патологических нейронов, с самой высокой эффективностью при 100 нМ ($LoCD = 31 \pm 14\%$; $p < 0.05$) (рис. 23Б). Эти результаты, совместно с обнаруженной ранее способностью EVP4593 снижать повышенный в патологических нейронах депо-управляемый вход кальция в клетку и количество лизосом/аутофагосом в мутантных нейронах в наномолярных концентрациях, делает EVP4593 ценным кандидатом в лекарственные средства от болезни Гентингтона.

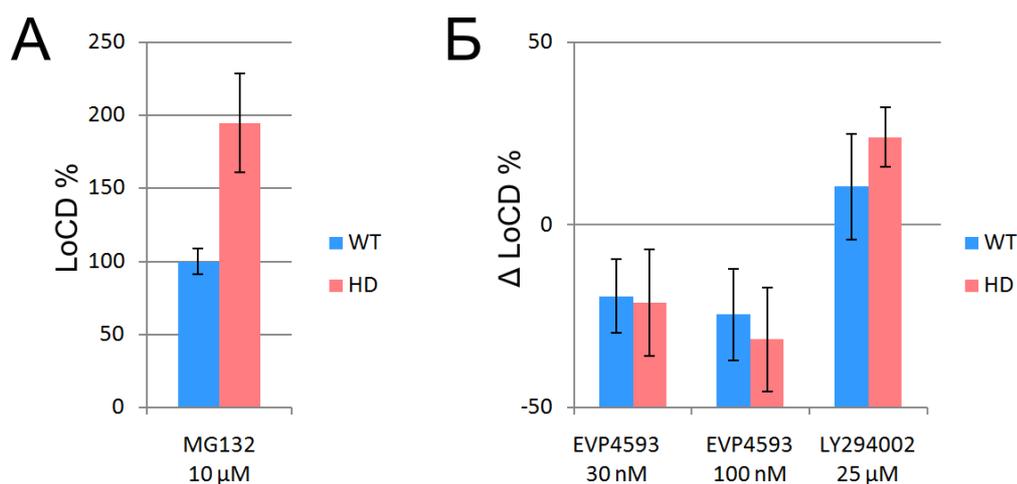


Рисунок 23. (А) – LoCD нормальных и патологических нейронов после обработки 24 часа 10 мкМ MG132. Значение WT представляет средний LoCD endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 нейронов, в то время как значение HD представляет средний LoCD iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 нейронов ($n = 30$). (Б) – Влияние EVP4593 и LY294002 на LoCD индуцированный 10 мкМ MG132. Значение WT представляет среднюю дельту LoCD endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 нейронов, в то время как значение HD представляет среднюю дельту LoCD iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 нейронов ($n = 30$).

За последние годы модели болезни Гентингтона позволили идентифицировать целый ряд новых химических молекул, демонстрирующих терапевтический потенциал лечения болезни Гентингтона. Так, Сяо и коллеги, используя нейроны, полученные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, продемонстрировали терапевтический эффект химического соединения

XPro1595, ингибитора растворимого TNF- α . Они обнаружили, что XPro1595 защищал нейроны человека, полученные из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона, от цитокин-индуцированной токсичности [109]. Известно, что TNF- α запускает каскад передачи сигналов, приводящий к активации NF- κ B [174]. Исследованное в данной диссертационной работе соединение EVP4593 является ингибитором NF- κ B. Ранее было обнаружено, что в клетках PC12, экспрессирующих мутантный хантингтин со 103 CAG-повторами, а также в нейронах стриатума, полученных из трансгенных мышей R6/2 со 155 CAG-повторами в мутантном *хантингтине* была обнаружена повышенная активность NF- κ B [175]. Более того, мутантный хантингтин связывается с IKK β , ключевым регулятором NF- κ B, и активирует его [175]. Следовательно можно предположить, что действие XPro1595 может быть опосредовано понижением активности NF- κ B. Это подтверждается и тем фактом, что в модели рассеянного склероза на мышцах с селективно нокаутированным IKK β в нейронах центральной нервной системы не было обнаружено нейропротективного действия XPro1595 [176]. Интересно, что NF- κ B также участвует в регуляции экспрессии Orai1, белка-субъединицы депо-управляемого кальциевого канала, и его активатора, STIM1. Люциферазный тест и иммунопреципитация хроматина, выполненные на клетках HEK293, идентифицировали NF- κ B-связывающие сайты в промоторной области генов STIM1 и Orai1, подходящие для NF- κ B зависимой регуляции их экспрессии. Также на HEK293 продемонстрировано, что депо-управляемый вход кальция в клетки увеличивался при оверэкспрессии NF- κ B и снижался под действием ингибитора NF- κ B wogonin. Однако маловероятно, что EVP4593 воздействует на этот путь, так как действие EVP4593 на депо-управляемый вход кальция в клетки проявляется почти сразу после применения вещества, в то время как изменения в экспрессии генов происходят относительно медленно. Го и соавторы разработали селективный ингибитор (P110-TAT) митохондриального белка деления DRP1 и продемонстрировали на нейронах, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона что обработка клеток P110-TAT снижает фрагментацию митохондрий и препятствует снижению длины нейритов [105]. Лу и коллеги с использованием эмбриональных фибробластов мыши, трансгенных по мутантному *хантингтину* с 97 CAG-повторами, и нейронов стриатума мыши, экспрессирующих эндогенный мутантный *хантингтин* со 111 CAG-повторами, обнаружили, что активность ATM повышена в клетках с мутантным *хантингтином*. Далее продемонстрировали, что ингибитор ATM KU-60019 обладает нейропротективными свойствами с использованием нейронов, полученных из ИПСК человека от пациентов с болезнью Гентингтона и других модельных систем [111]. ATM – PI3K-подобная серин/треониновая протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется двуниевыми разрывами ДНК [177]. В недавнем исследовании с использованием двух моделей ламинопатии на мышцах (дефицитная по *Zmpste24* и с мутацией в гене *Lmna* G609G), продемонстрировано,

что накопление белка-предшественника ламина А в ядерной оболочке запускает сигнальный путь ATM, что приводит к активации NF-κB и секреции высоких уровней провоспалительных цитокинов [178]. Для ламинопатий характерны искривления формы клеточного ядра, похожие на обнаруженные в данном диссертационном исследовании инвагинации ядерной оболочки [179]. Отсюда можно предположить, что обнаруженные в данном диссертационном исследовании изменения в форме клеточного ядра принадлежат к тому же сигнальному пути, что и повышенный депо-управляемый вход кальция в клетки и повышенная активность ATM. Однако изменения в форме клеточного ядра, вероятно, лежат вверху сигнального каскада, что также косвенно подтверждается отсутствием воздействия EVP4593 на форму клеточного ядра. Интересным дополнением является то, что в трансгенной по N-концевому фрагменту гена *хантингтина* человека со 128 CAG-повторами модели на *Drosophila melanogaster* снижение экспрессии ATM методом нокаута одного из аллелей также как и EVP4593 улучшает двигательный фенотип [111]. Точный молекулярный механизм действия EVP4593 до сих пор не известен, однако известно, что регулируемый EVP4593 депо-управляемый вход кальция в клетки опосредован в основном каналами, содержащими белок TRPC1, при этом необходимо присутствие белка STIM1, который выполняет функцию сенсора кальция в эндоплазматическом ретикулуме [7]. STIM1 является мембранным белком эндоплазматического ретикулума и плазматической мембраны с одним трансмембранным доменом. Считается, что STIM1 в основном локализован в мембране эндоплазматического ретикулума, и только около 15-25% STIM1 локализовано на плазматической мембране клеток [180]. Ранее на линии клеток нейробластомы человека SK-N-SH, трансгенных по первому экзону гена *хантингтина* со 138 CAG-повторами, было продемонстрировано, что подавление экспрессии *STIM1* с использованием siRNA приводит к снижению тапсигаргин-индуцированных токов с 2.86 ± 0.24 до 0.91 ± 0.07 пА/пФ [181]. Можно предположить, что наблюдаемое действие EVP4593 опосредовано STIM1. Известно, что мутантный хантингтин сенсibiliзирует рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R), что приводит к выходу ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и запуску депо-управляемого входа кальция в клетку [182]. Повышенный депо-управляемый вход кальция может способствовать накоплению ионов кальция в клетке, что токсично для нейронов [182]. Этот механизм может лежать в основе нейродегенерации при болезни Гентингтона и хорошо подходит для объяснения механизма защиты нейронов от гибели при болезни Гентингтона. Соединение EVP4593 продемонстрировало способность понижать депо-управляемый вход кальция на трансгенных нейронах стриатума мыши, трансгенной линии нейробластомы человека и нейронах, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, снижать содержание лизосом/аутофагосом в нейронах, дифференцированных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, а также способность

спасать от гибели трансгенные нейроны мыши в модели глутамат индуцированного апоптоза и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона в модели стареющих нейронов. Эти результаты, в совокупности с теоретическими основами терапевтического действия EVR4593, делают это соединение перспективным потенциальным лекарством от болезни Гентингтона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для большинства нейродегенеративных заболеваний эффективные методы терапии пока еще не разработаны. Это связано с ограниченностью доступа исследователей к прижизненному изучению процесса нейродегенерации человека и отсутствием адекватных модельных систем для исследования патогенеза заболеваний и тестирования лекарственных средств. Поиск и разработка новых моделей для таких нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Гентингтона, является актуальной задачей.

К моменту начала в 2010 году настоящей диссертационной работы в литературе была описана только одна линия ИПСК от пациента с болезнью Гентингтона [53] и только одно исследование с использованием ИПСК в качестве инструмента для моделирования болезни Гентингтона [103]. Ввиду новизны подхода, лишь 3 года прошло с момента получения первых ИПСК человека в 2007 году независимо группами Джеймса Томсона и Шинья Яманака [22,23], методы моделирования нейродегенеративных заболеваний с помощью ИПСК были практически не исследованы.

В процессе выполнения работы был создан и охарактеризован набор гетерозиготных линий ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона с малым количеством избыточных CAG-повторов в гене *HTT*, соответствующих классической форме болезни Гентингтона. Несмотря на то, что уже опубликовано порядка десятка линий ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, полученные в процессе данного диссертационного исследования ИПСК представляют интерес для мирового научного сообщества. Полученные и охарактеризованные на молекулярно-генетическом уровне линии ИПСК имеют CAG-повторы с невысокой степенью амплификации, однако дифференцированные из этих ИПСК нейроны достоверно воспроизводят морфологически и функционально мутантный фенотип вне зависимости от различного генетического фона. На сегодняшний день уже опубликованы протоколы дифференцировки ИПСК во многие типы специализированных клеток, однако, получение из ИПСК чистых культур клеток определенного типа до сих пор является сложной проблемой на грани возможностей. В данной работе впервые из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона были получены и охарактеризованы культуры клеток, морфологически, транскрипционно и функционально аналогичные срединным шипиковым нейронам стриатума. Впервые культуры нейронов, дифференцированные из ИПСК с мутацией в гене *HTT* продемонстрировали ранее обнаруженные проявления болезни Гентингтона на клеточном уровне, такие как формирование агрегатов мутантного хантингтина, повышенное содержание лизосом/аутофагосом в нейронах, инвагинации ядерной оболочки и повышенную склонность к клеточной смерти при моделировании старения путем снижения протеасомной активности. В данной

диссертационной работе продемонстрировано, что инвагинации ядерной оболочки в культуре нейронов могут быть измерены количественно методом морфометрии микрофотографий окрашенных клеточных ядер и использованы для исследования действия химических соединений и потенциальных лекарств на культуры нейронов или другие клетки. Практическая возможность использования разработанной в данном диссертационном исследовании клеточной модели для поиска и изучения новых лекарств продемонстрирована на примере потенциального лекарства EVP4593, обнаруженного ранее с использованием трансгенной модели болезни Гентингтона. Потенциальное лекарство EVP4593 показало способность снижать повышенное содержание лизосом/аутофагосом в патологических нейронах, снижать повышенный в патологических нейронах депо-управляемый вход кальция в клетку, а также оказывать нейропротекторное действие на патологические нейроны при моделировании их старения.

Разработанная в данном диссертационном исследовании модельная система может быть полезна для решения прикладных задач разработки новых лекарств от болезни Гентингтона. Так, задача выбора кандидата в лекарственное средство, которая часто решается скринингом с использованием более простых модельных систем, для последующих клинических испытаний является не тривиальной задачей. Сделать правильный выбор исключительно важно, так как затраты на клинические испытания превосходят затраты на доклинические исследования на 1-2 порядка. По этой причине валидация, то есть подтверждение терапевтических свойств молекул-кандидатов в лекарственные средства, имеет высокую практическую значимость. Лауреат Нобелевской премии Шинья Яманака даже предложил ввести дополнительную фазу 1.5 клинических испытаний лекарственных средств, в основе которой лежит применение модельных систем на основе ИПСК, что, в отличие от трансгенных моделей, позволит учитывать сложную генетическую этиологию заболеваний [54]. Разработанная в данном диссертационном исследовании модельная система продемонстрировала воспроизведение целого ряда проявлений болезни Гентингтона, а также возможность количественной оценки этих проявлений. Такая модельная система может быть крайне полезна для валидации перспективных лекарственных средств от болезни Гентингтона до перехода к клиническим испытаниям.

ВЫВОДЫ

1. С использованием технологии генетического репрограммирования создана коллекция линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с болезнью Гентингтона с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* и проведена их характеристика.
2. Разработан воспроизводимый и высокоэффективный протокол дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума.
3. Впервые показано, что дифференцированные *in vitro* нейроны, несущие избыточное количество CAG-повторов (40-47) в гене *HTT*, имеют повышенную лизосомальную активность, демонстрируют повышенную частоту инвагинаций ядерной оболочки по сравнению с контрольными нейронами, а также повышенный депо-управляемый вход кальция.
4. На модели нейродегенерации стареющих *in vitro* пациент-специфичных срединных шипиковых нейронов стриатума, дифференцированных из генетически репрограммированных соматических клеток носителей болезни Гентингтона, впервые продемонстрировано терапевтическое действие малой химической молекулы EVP4593.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВКМ – внутренняя клеточная масса (бластоцисты)
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- кДНК – комплементарная ДНК, синтезированная на матрице зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой.
- мРНК – матричная РНК
- МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПСК – плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК и ЭСК)
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- п.н. – пар нуклеотидов
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
- DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)
- FC – проточный цитофлуориметрический анализ (flow cytometry)
- g – ускорение свободного падения (9.8 м/с^2)
- GFP – зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein)
- IRES – участок внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site)
- iPS – индуцированные плюрипотентные стволовые (клетки, клеточные клоны, линии клеток) (induced pluripotent stem cells)
- LoCD – уровень гибели клеток (level of cell death)
- MOI – множественность инфекции (multiplicity of infection)
- siRNA – короткая интерферирующая РНК
- VPA – вальпроевая кислота (valproic acid)

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ**Статьи в рецензируемых научных журналах перечня ВАК:**

1. **Некрасов Е.Д.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как модель для изучения болезней человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 2. С. 32-37.
2. **Некрасов Е.Д.**, Лебедева О.С., Честков И.В., Сюсина М.А., Федотова Е.Ю., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 4. С. 82-88.
3. **Некрасов Е.Д.**, Лебедева О.С., Васина Е.М., Богомазова А.Н., Честков И.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Ключников С.А., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2012. Т. 6. № 4. С. 30-35.
4. Панова А.В., **Некрасов Е.Д.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Богомазова А.Н. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории. // Acta Naturae. 2013. Т. 5, № 2. С. 54-61.
5. Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Panova A.V., **Nekrasov E.D.**, Kiselev S.L. Reactivation of X chromosome upon reprogramming leads to changes in the replication pattern and 5hmC accumulation. // Chromosoma. 2014. Vol. 123, № 1-2. P. 117-28.
6. Богомазова А.Н., Васина Е.М., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Лебедева О.С., **Некрасов Е.Д.**, Панова А.В., Филоненко Е.С., Хомякова Е.А., Цховребова Л.В., Честков И.В., Шутова М.В. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования. // Генетика. 2015. Т. 51. № 4. С. 466.

Коллективная монография:

Некрасов Е.Д., Честков И.В., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Репрограммирование соматических клеток: возможности применения для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. Угрюмова М.В. — Москва: Научный мир, 2014.

Тезисы докладов и материалы конференций (избранное):

1. **Некрасов Е.Д.**, Честков И.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А. Получение индуцированных стволовых клеток из фибробластов кожи больных наследственной формой болезни Паркинсона // Труды 53-й научной конференции МФТИ «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». Часть IV. Молекулярная и биологическая физика. — Москва: МФТИ, 2010. С. 204-205.
2. **Некрасов Е.Д.**, Сюсина М.А., Честков И.В., Лебедева О.С., Киселев С.Л., Лагарькова М.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи пациента, страдающего болезнью Гентингтона, для построения *in vitro* модели болезни Гентингтона // Труды 54-й научной конференции МФТИ «Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе». Молекулярная и биологическая физика. — Москва: МФТИ, 2011. С. 114-115.
3. **Некрасов Е.Д.** Получение индуцированных стволовых клеток из фибробластов кожи больных наследственными формами нейродегенеративных заболеваний // Сборник трудов Всероссийской молодёжной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук», проводимой в рамках Второй международной научной школы для молодёжи «Прикладные математика и физика: от фундаментальных исследований к инновациям»: сб. науч. тр. — Москва: МФТИ, 2011. С. 87-88.
4. **Nekrasov E.D.**, Lebedeva O.S., Chestkov I.V., Susina M.A., Grivennikov I.A., Illarioshkin S.N., Kiselev S.L., Lagarkova M.A. Induced pluripotent stem cells based model system for studying Huntington's disease. // International Society for Stem Cell Research (ISSCR). ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13-16, 2012.
5. **Некрасов Е.Д.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в обогащенные популяции ГАМК-эргических нейронов стриатума // Труды 55-й научной конференции МФТИ: Всероссийской научной конференции «Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе», Научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук в области физики и астрономии», Всероссийской молодёжной научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». Молекулярная и биологическая физика. — Москва: МФТИ, 2012. С. 106-107.
6. **Некрасов Е.Д.**, Кострюкова Е.С., Говорун В.М., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. Сравнительный анализ нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с болезнью Гентингтона и здоровых пациентов // Труды

конференции: «VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы». — Ростов-на-Дону: ФГУП «Издательство СО РАН», 2014. С. 114.

7. **Некрасов Е.Д.** Изучение молекулярных механизмов хореи Гентингтона с использованием репрограммированных клеток человека // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». — Казань: КФУ, 2014. С. 125.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своему научному руководителю Сергею Львовичу Киселеву за научное руководство, а также Марии Андреевне Лагарьковой за наставничество в работе. Благодарю весь коллектив отдела эпигенетики ИОГен РАН за поддержку, особая благодарность Екатерине Васиной, Александре Богомазовой, Ольге Лебедевой и Илье Честкову.

Выражаю благодарность Сергею Анатольевичу Ключникову, Сергею Николаевичу Иллариошкину, Алексею Николаевичу Томилину, Владимиру Александровичу Вигонту, Елене Валентиновне Казначеевой, Любви Александровне Сульдиной и Елене Владимировне Киселевой за участие в работе.

Выражаю свою признательность Сергею Александровичу Брускину и Александру Эдуардовичу Дитятеву за конструктивные замечания, высказанные ими на стадии апробации диссертации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. // *Cell*. 1993. Vol. 72, № 6. P. 971–983.
2. Walker F.O. Huntington's disease. // *Lancet*. 2007. Vol. 369, № 9557. P. 218–228.
3. Bonelli R.M., Wenning G.K., Kapfhammer H.P. Huntington's disease: present treatments and future therapeutic modalities. // *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2004. Vol. 19, № 2. P. 51–62.
4. Frank S., Jankovic J. Advances in the pharmacological management of Huntington's disease. // *Drugs*. 2010. Vol. 70, № 5. P. 561–571.
5. Jucker M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16, № 11. P. 1210–1214.
6. Teschendorf D., Link C.D. What have worm models told us about the mechanisms of neuronal dysfunction in human neurodegenerative diseases? // *Mol. Neurodegener.* 2009. Vol. 4, № 38.
7. Wu J. et al. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. // *Chem. Biol.* 2011. Vol. 18, № 6. P. 777–793.
8. Götz J., Ittner L.M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. Vol. 9, № 7. P. 532–544.
9. Colman A. Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel laureates in medicine or physiology. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 15. P. 5740–5741.
10. Briggs R., King T.J. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1952. Vol. 38, № 5. P. 455–463.
11. Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1962. Vol. 10, № 4. P. 622–640.
12. Campbell K.H. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. // *Nature*. 1996. Vol. 380, № 6569. P. 64–66.
13. Wilmut I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. // *Nature*. 1997. Vol. 385, № 6619. P. 810–813.
14. Tachibana M. et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. // *Cell*. 2013. Vol. 153, № 6. P. 1228–1238.
15. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. // *Nature*. 1981. Vol. 292, № 5819. P. 154–156.
16. Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981. Vol. 78, № 12. P. 7634–7638.

17. Thomson J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. // *Science*. 1998. Vol. 282, № 5391. P. 1145–1147.
18. Misra R.P. et al. Generation of single-copy transgenic mouse embryos directly from ES cells by tetraploid embryo complementation. // *BMC Biotechnol.* 2001. Vol. 1, № 12.
19. Eggan K. et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 11. P. 6209–6214.
20. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell*. 2006. Vol. 126, № 4. P. 663–676.
21. Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. // *Cell*. 1987. Vol. 51, № 6. P. 987–1000.
22. Takahashi K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 5. P. 861–872.
23. Yu J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. // *Science*. 2007. Vol. 318, № 5858. P. 1917–1920.
24. Li W. et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. // *Cell Stem Cell*. 2009. Vol. 4, № 1. P. 16–19.
25. Liu H. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 3, № 6. P. 587–590.
26. Kwon D.-J. et al. Generation of leukemia inhibitory factor-dependent induced pluripotent stem cells from the Massachusetts General Hospital miniature pig. // *Biomed Res. Int.* 2013. Vol. 2013, № 140639.
27. Aasen T. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 11. P. 1276–1284.
28. Eminli S. et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. // *Stem Cells*. 2008. Vol. 26, № 10. P. 2467–2474.
29. Aoi T. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. // *Science*. 2008. Vol. 321, № 5889. P. 699–702.
30. Hanna J. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. // *Cell*. 2008. Vol. 133, № 2. P. 250–264.
31. Lagarkova M.A. et al. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. // *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9, № 5. P. 937–946.
32. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. // *Genes Dev. Cold Spring Harbor Lab*, 2010. Vol. 24, № 20. P. 2239–2263.

33. Stadtfeld M. et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 2, № 3. P. 230–240.
34. Okita K. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. // *Science*. 2008. Vol. 322, № 5903. P. 949–953.
35. Woltjen K. et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. // *Nature*. 2009. Vol. 458, № 7239. P. 766–770.
36. Warren L. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 7, № 5. P. 618–630.
37. Zhou W., Freed C.R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells*. 2009. Vol. 27, № 11. P. 2667–2674.
38. Fusaki N. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. Vol. 85, № 8. P. 348–362.
39. Yu J. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. // *Science*. 2009. Vol. 324, № 5928. P. 797–801.
40. Kim D. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. // *Cell Stem Cell*. 2009. Vol. 4, № 6. P. 472–476.
41. Shi Y. et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 2, № 6. P. 525–528.
42. Li W. et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. // *Stem Cells*. 2009. Vol. 27, № 12. P. 2992–3000.
43. Huangfu D. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 11. P. 1269–1275.
44. Hou P. et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. // *Science*. 2013. Vol. 341, № 6146. P. 651–654.
45. Rais Y. et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. // *Nature*. 2013. Vol. 502, № 7469. P. 65–70.
46. Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. // *Cell*. 2010. Vol. 143, № 4. P. 508–525.
47. Zhao X. et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. // *Nature*. 2009. Vol. 461, № 7260. P. 86–90.
48. Богомазова А.Н. et al. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования // *Генетика*. 2015. Т. 51, № 4. С. 466.

49. Ma L. et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. // *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 2012. Vol. 10, № 4. P. 455–464.
50. Kriks S. et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. // *Nature*. 2011. Vol. 480, № 7378. P. 547–551.
51. Amoroso M.W. et al. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. // *J. Neurosci*. 2013. Vol. 33, № 2. P. 574–586.
52. Espuny-Camacho I. et al. Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. // *Neuron*. 2013. Vol. 77, № 3. P. 440–456.
53. Park I.-H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. // *Cell*. 2008. Vol. 134, № 5. P. 877–886.
54. Inoue H. et al. iPS cells: a game changer for future medicine. // *EMBO J*. 2014. Vol. 33, № 5. P. 409–417.
55. Некрасов Е.Д. et al. Репрограммирование соматических клеток: возможности применения для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения // *Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. Угрюмова М.В.* Москва: Научный мир, 2014.
56. Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. // *Am. J. Public Health*. 1998. Vol. 88, № 9. P. 1337–1342.
57. Ooi L. et al. Induced pluripotent stem cells as tools for disease modelling and drug discovery in Alzheimer's disease. // *J. Neural Transm*. 2013. Vol. 120, № 1. P. 103–111.
58. Yagi T. et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. // *Hum. Mol. Genet*. 2011. Vol. 20, № 23. P. 4530–4539.
59. Yahata N. et al. Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 9. P. e25788.
60. Israel M.A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. // *Nature*. 2012. Vol. 482, № 7384. P. 216–220.
61. Kondo T. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. // *Cell Stem Cell*. 2013. Vol. 12, № 4. P. 487–496.
62. Sproul A.A. et al. Characterization and Molecular Profiling of PSEN1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Progenitors. // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 1. P. e84547.

63. Young J.E. et al. Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell*. 2015. Vol. 16, № 4. P. 373–385.
64. Bhugra D. The global prevalence of schizophrenia. // *PLoS Med*. 2005. Vol. 2, № 5. P. e151; quiz e175.
65. Sullivan P.F., Kendler K.S., Neale M.C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. // *Arch. Gen. Psychiatry*. 2003. Vol. 60, № 12. P. 1187–1192.
66. Jaaro-Peled H. et al. Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. // *Schizophr. Bull*. 2010. Vol. 36, № 2. P. 301–313.
67. Harrison P.J. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. // *Brain*. 1999. Vol. 122, № 4. P. 593–624.
68. Brennand K.J. et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. // *Nature*. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 473, № 7346. P. 221–225.
69. Robicsek O. et al. Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. // *Mol. Psychiatry*. 2013. Vol. 18, № 10. P. 1067–1076.
70. Maschietto M. et al. Co-expression network of neural-differentiation genes shows specific pattern in schizophrenia. // *BMC Med. Genomics*. 2015. Vol. 8, № 23.
71. Bruijn L.I., Miller T.M., Cleveland D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. // *Annu. Rev. Neurosci*. 2004. Vol. 27. P. 723–749.
72. Cleveland D.W., Rothstein J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2001. Vol. 2, № 11. P. 806–819.
73. Rosen D.R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. // *Nature*. 1993. Vol. 362, № 6415. P. 59–62.
74. Nagai M. et al. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. // *J. Neurosci*. 2001. Vol. 21, № 23. P. 9246–9254.
75. Reaume A.G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. // *Nat. Genet*. 1996. Vol. 13, № 1. P. 43–47.
76. Clement A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. // *Science*. 2003. Vol. 302, № 5642. P. 113–117.
77. Boillée S. et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. // *Science*. 2006. Vol. 312, № 5778. P. 1389–1392.

78. Di Giorgio F.P. et al. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. // *Nat. Neurosci.* 2007. Vol. 10, № 5. P. 608–614.
79. Di Giorgio F.P. et al. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. // *Cell Stem Cell.* 2008. Vol. 3, № 6. P. 637–648.
80. Johnston J.A. et al. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 23. P. 12571–12576.
81. Gruzman A. et al. Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 30. P. 12524–12529.
82. Shibata N. et al. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. // *Dev. Neurosci.* 1996. Vol. 18, № 5-6. P. 492–498.
83. Urushitani M. et al. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 83, № 5. P. 1030–1042.
84. Dimos J.T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. // *Science.* 2008. Vol. 321, № 5893. P. 1218–1221.
85. Chestkov I. V et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for SOD1-Associated Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis Studies. // *Acta Naturae.* 2014. Vol. 6, № 1. P. 54–60.
86. De Lau L.M.L., Breteler M.M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. // *Lancet Neurol.* 2006. Vol. 5, № 6. P. 525–535.
87. Nguyen H.N. et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. // *Cell Stem Cell.* 2011. Vol. 8, № 3. P. 267–280.
88. Liu G.-H. et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. // *Nature.* 2012. Vol. 491, № 7425. P. 603–607.
89. Chung C.Y. et al. Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. // *Science.* 2013. Vol. 342, № 6161. P. 983–987.
90. Ohta E. et al. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagamihara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 β signaling pathway. // *Hum. Mol. Genet.* 2015. Vol. 24, № 17. P. 4879–4900.
91. Yager L.M. et al. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. // *Neuroscience.* 2015. № 301. P. 529–541.

92. Harper B. Huntington disease. // *J. R. Soc. Med.* 2005. Vol. 98, № 12. P. 550.
93. Potter N.T., Spector E.B., Prior T.W. Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. // *Genet. Med.* Vol. 6, № 1. P. 61–65.
94. Langbehn D.R. et al. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. // *Clin. Genet.* 2004. Vol. 65, № 4. P. 267–277.
95. Aziz N.A. et al. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. // *Neurology.* 2009. Vol. 73, № 16. P. 1280–1285.
96. Illarioshkin S.N. et al. Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease. // *Ann. Neurol.* 1994. Vol. 36, № 4. P. 630–635.
97. DiFiglia M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. // *Science.* 1997. Vol. 277, № 5334. P. 1990–1993.
98. Aki T. et al. Impairment of autophagy: from hereditary disorder to drug intoxication. // *Toxicology.* Elsevier Ireland Ltd, 2013. Vol. 311, № 3. P. 205–215.
99. Bezprozvanny I., Hayden M.R. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 322, № 4. P. 1310–1317.
100. Ayala-Peña S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 62. P. 102–110.
101. Quintanilla R. a et al. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. // *Mol. Neurodegener.* 2013. Vol. 8, № 45.
102. Tabrizi S.J. et al. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: Analysis of 36-month observational data // *Lancet Neurol.* 2013. Vol. 12, № 7. P. 637–649.
103. Zhang N. et al. Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. // *PLoS Curr.* 2010. Vol. 2. P. RRN1193.
104. An M.C. et al. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell.* 2012. Vol. 11, № 2. P. 253–263.
105. Guo X. et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol. 123, № 12. P. 5371–5388.
106. Camnasio S. et al. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. // *Neurobiol. Dis.* Elsevier Inc., 2012. Vol. 46, № 1. P. 41–51.
107. The HD iPSC Consortium. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. // *Cell Stem Cell.* 2012. Vol. 11, № 2. P. 264–278.

108. Jeon I. et al. Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, № 9. P. 2054–2062.
109. Hsiao H.-Y. et al. Inhibition of soluble tumor necrosis factor is therapeutic in Huntington's disease. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. Vol. 23, № 16. P. 4328–4344.
110. Mattis V.B. et al. HD iPSC-derived neural progenitors accumulate in culture and are susceptible to BDNF withdrawal due to glutamate toxicity. // *Hum. Mol. Genet.* 2015. Vol. 24, № 11. P. 3257–3271.
111. Lu X.-H. et al. Targeting ATM ameliorates mutant Huntingtin toxicity in cell and animal models of Huntington's disease. // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 268. P. 268ra178.
112. Chae J.-I. et al. Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. // *Biochem. J.* 2012. Vol. 446, № 3. P. 359–371.
113. McQuade L.R. et al. Proteomics of Huntington's Disease-Affected Human Embryonic Stem Cells Reveals an Evolving Pathology Involving Mitochondrial Dysfunction and Metabolic Disturbances. // *J. Proteome Res.* 2014. Vol. 13, № 12. P. 5648–5659.
114. Subramaniam S. et al. Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. // *Science*. 2009. Vol. 324, № 5932. P. 1327–1330.
115. Nekrasov E.D. et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons.
116. Eden E. et al. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences // *PLoS Comput. Biol.* 2007. Vol. 3, № 3. P. 0508–0522.
117. Eden E. et al. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. // *BMC Bioinformatics*. 2009. Vol. 10, № 48.
118. Ebert A.D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. // *Nature*. 2009. Vol. 457, № 7227. P. 277–280.
119. Hester M.E. et al. Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 9. P. e7044.
120. Ye Z. et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders // *Blood*. 2009. Vol. 114, № 27. P. 5473–5480.
121. Philonenko E.S. et al. Current progress and potential practical application for human pluripotent stem cells. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011. Vol. 292. P. 153–196.
122. Saha K., Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. // *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 2009. Vol. 5, № 6. P. 584–595.
123. Juopperi T.A. et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. // *Mol. Brain*. 2012. Vol. 5, № 17.

124. Carey B.W. et al. Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2011. Vol. 9, № 6. P. 588–598.
125. Rodríguez-Pizà I. et al. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. // *Stem Cells*. 2010. Vol. 28, № 1. P. 36–44.
126. Ludwig T.E. et al. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. // *Nat. Methods*. 2006. Vol. 3, № 8. P. 637–646.
127. Chen G. et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. // *Nat. Methods*. 2011. Vol. 8, № 5. P. 424–429.
128. Hotta A., Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. // *J. Cell. Biochem*. 2008. Vol. 105, № 4. P. 940–948.
129. Huangfu D. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. // *Nat. Biotechnol*. 2008. Vol. 26, № 7. P. 795–797.
130. Shi Y. et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. // *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 3, № 5. P. 568–574.
131. Slow E.J. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease // *Hum. Mol. Genet*. 2003. Vol. 12, № 13. P. 1555–1567.
132. Hodgson J.G. et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration // *Neuron*. 1999. Vol. 23, № 1. P. 181–192.
133. Amps K. et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. // *Nat. Biotechnol*. 2011. Vol. 29, № 12. P. 1132–1144.
134. Lagarkova M.A. et al. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. // *Cell Cycle*. 2006. Vol. 5, № 4. P. 416–420.
135. Bradley C.K. et al. Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. // *Stem Cells Dev*. 2011. Vol. 20, № 3. P. 495–502.
136. Jacquet L. et al. Three Huntington's Disease Specific Mutation-Carrying Human Embryonic Stem Cell Lines Have Stable Number of CAG Repeats upon In Vitro Differentiation into Cardiomyocytes. // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 5. P. e0126860.
137. Aubry L. et al. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2008. Vol. 105, № 43. P. 16707–16712.

138. Ouimet C.C., Langley-Gullion K.C., Greengard P. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. // *Brain Res.* 1998. Vol. 808, № 1. P. 8–12.
139. Hawrylycz M.J. et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. // *Nature.* 2012. Vol. 489, № 7416. P. 391–399.
140. Le Carrouer T. et al. Amazonia!: An Online Resource to Google and Visualize Public Human whole Genome Expression Data // *Open Bioinforma. J.* 2010. Vol. 4, № 1. P. 5–10.
141. Carri A.D. et al. Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. // *Development.* 2013. Vol. 140, № 2. P. 301–312.
142. Tepper J.M. et al. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. // *Front. Neuroanat.* 2010. Vol. 4, № 150.
143. Sunwoo J.-S., Lee S.-T., Kim M. A case of juvenile huntington disease in a 6-year-old boy. // *J. Mov. Disord.* 2010. Vol. 3, № 2. P. 45–47.
144. Li X.J. et al. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. // *Nature.* 1995. Vol. 378, № 6555. P. 398–402.
145. Liu K.-Y. et al. Disruption of the nuclear membrane by perinuclear inclusions of mutant huntingtin causes cell-cycle re-entry and striatal cell death in mouse and cell models of Huntington's disease // *Hum. Mol. Genet.* 2014. Vol. 24, № 6. P. 1602–1616.
146. Davies S.W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. // *Cell.* 1997. Vol. 90, № 3. P. 537–548.
147. Sapp E. et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. // *Ann. Neurol.* 1997. Vol. 42, № 4. P. 604–612.
148. Djoussé L. et al. Weight loss in early stage of Huntington's disease. // *Neurology.* 2002. Vol. 59, № 9. P. 1325–1330.
149. Sathasivam K. et al. Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8, № 5. P. 813–822.
150. Feigin A. et al. Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18)F]FDG PET study. // *J. Nucl. Med.* 2001. Vol. 42, № 11. P. 1591–1595.
151. Ciarmiello A. et al. Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease. // *J. Nucl. Med.* 2006. Vol. 47, № 2. P. 215–222.
152. Brennan W.A., Bird E.D., Aprille J.R. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. // *J. Neurochem.* 1985. Vol. 44, № 6. P. 1948–1950.
153. Roos R.A., Bots G.T. Nuclear membrane indentations in Huntington's chorea. // *J. Neurol. Sci.* 1983. Vol. 61, № 1. P. 37–47.

154. Ravikumar B., Rubinsztein D.C. Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? // *Neuroreport*. 2004. Vol. 15, № 16. P. 2443–2445.
155. Veltri R.W. et al. Nuclear roundness variance predicts prostate cancer progression, metastasis, and death: A prospective evaluation with up to 25 years of follow-up after radical prostatectomy. // *Prostate*. 2010. Vol. 70, № 12. P. 1333–1339.
156. Lammerding J. et al. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 35. P. 25768–25780.
157. Seo H. et al. Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells // *PLoS One*. 2007. Vol. 2, № 2. P. e238.
158. Scheuing L. et al. Preclinical and clinical investigations of mood stabilizers for Huntington's disease: what have we learned? 2014. Vol. 10, № 9. P. 1024–1038.
159. Gdula M.R. et al. Remodeling of three-dimensional organization of the nucleus during terminal keratinocyte differentiation in the epidermis. // *J. Invest. Dermatol.* 2013. Vol. 133, № 9. P. 2191–2201.
160. Gervais F.G. et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 2. P. 95–105.
161. Eriguchi M. et al. alpha Pix enhances mutant huntingtin aggregation // *J. Neurol. Sci.* 2010. Vol. 290, № 1-2. P. 80–85.
162. Yamamoto A., Cremona M.L., Rothman J.E. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 172, № 5. P. 719–731.
163. Lorenzl S. et al. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases // *J. Neurol. Sci.* 2003. Vol. 207, № 1-2. P. 71–76.
164. Runne H. et al. Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 36. P. 14424–14429.
165. Kalathur R.K., Hernández-Prieto M.A., Futschik M.E. Huntington's Disease and its therapeutic target genes: A global functional profile based on the HD Research Crossroads database // *BMC Neurology*. 2012. Vol. 12, № 1. P. 47.
166. Lloyd-Evans E., Platt F.M. Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. // *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50, № 2. P. 200–205.
167. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends Mol. Med.* 2009. Vol. 15, № 3. P. 89–100.
168. Estrada Sánchez A.M., Mejía-Toiber J., Massieu L. Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease // *Archives of Medical Research*. 2008. Vol. 39, № 3. P. 265–276.

169. Glushankova L.N. et al. Changes in the store-dependent calcium influx in a cellular model of Huntington's disease. // *Dokl. Biol. Sci.* 2010. Vol. 433. P. 293–295.
170. Morimoto R.I., Cuervo A.M. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. Vol. 69 Suppl 1. P. S33–S38.
171. Xie W. et al. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 115, № 1. P. 188–199.
172. Ortuño-Sahagún D., Pallàs M., Rojas-Mayorquín A.E. Oxidative stress in aging: Advances in proteomic approaches // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Vol. 2014, № 573208.
173. Miller J.D. et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging // *Cell Stem Cell.* 2013. Vol. 13, № 6. P. 691–705.
174. Bouwmeester T. et al. A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway // *Nat. Cell Biol.* 2004. Vol. 6, № 2. P. 97–105.
175. Khoshnan A. et al. Activation of the I κ B kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24, № 37. P. 7999–8008.
176. Taoufik E. et al. Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor- κ B // *Brain.* 2011. Vol. 134, № 9. P. 2722–2735.
177. Shiloh Y., Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. Vol. 14, № 4. P. 197–210.
178. Osorio F.G. et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response // *Genes Dev.* 2012. Vol. 26, № 20. P. 2311–2324.
179. Paradisi M. et al. Dermal fibroblasts in Hutchinson-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. // *BMC Cell Biol.* 2005. Vol. 6, № 27.
180. Dziadek M.A., Johnstone L.S. Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins // *Cell Calcium.* 2007. Vol. 42, № 2. P. 123–132.
181. Vigont V.A. et al. STIM1 Protein Activates Store-Operated Calcium Channels in Cellular Model of Huntington's Disease. // *Acta Naturae.* 2014. Vol. 6, № 4. P. 40–47.
182. Tang T.-S. et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. // *Neuron.* 2003. Vol. 39, № 2. P. 227–239.