

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики
Российской академии наук

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

На правах рукописи

Лебедева Ольга Сергеевна

Создание модельной системы для изучения функции генов,
ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием
технологии генетического репрограммирования

Специальность 03.02.07 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., проф. РАН Лагарькова Мария Андреевна

д.б.н., проф. Гривенников Игорь Анатольевич

Москва 2016

Оглавление

Введение.....	6
1.Обзор литературы	12
1.1 Репрограммирование и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.....	12
1.1.1. Понятие репрограммирования, методы репрограммирования.....	12
1.1.1.1. Генетическое репрограммирование. Гены, участвующие в репрограммировании	14
1.1.2. Интеграционные и неинтеграционные методы генетического репрограммирования.....	15
1.1.3. Характерные особенности ИПСК.....	19
1.1.3.1. Морфологические характеристики ИПСК человека	19
1.1.3.2. Молекулярные характеристики ИПСК	20
1.1.3.3. Сходство ИПСК и ЭСК человека по паттернам экспрессии генов и метилирования ДНК.....	21
1.1.3.4. Метилирование ДНК в процессе репрограммирования	22
1.1.3.5. Плюрипотентность ИПСК.....	26
1.1.4. Направленная дифференцировка ИПСК в нейроны	27
1.2 Болезнь Паркинсона	31
1.2.1. Патогенез болезни Паркинсона на клеточном уровне	33
1.2.2. Причины развития БП.....	35
1.2.2.1. Внешние факторы, вызывающие БП.....	35
1.2.2.2. Наследственные факторы, вызывающие развитие БП	36
1.2.2.2.1. SNCA (PARK1/4)	37
1.2.2.2.2. PINK1 (PARK6).....	37
1.2.2.2.3. DJ-1 (PARK7)	38
1.2.2.2.4. LRRK2 (PARK8)	39
1.2.2.2.5. PRKN (PARK2)	40
1.2.3. Модели БП на основе ИПСК.....	41
2.Материалы и методы.....	45
2.1 Реагенты и материалы исследования	45

2.1.1. Базовые среды и добавки к ним	45
2.1.2. Рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения	45
2.1.3. Другие реактивы для работы с культурами клеток	46
2.1.4. Реактивы для молекулярной биологии	46
2.1.5. Расходные материалы	47
2.1.6. Составы сред для культивирования клеток	47
2.2. Протоколы экспериментов	48
2.2.1. Информация о донорах биологического материала	48
2.2.2. Получение первичных культур фибробластов кожи пациентов	48
2.2.3. Получение лентивирусов	49
2.2.4. Получение ИПСК с помощью лентивирусных векторов	50
2.2.5. Получение ИПСК человека с помощью генетических конструкций на основе вируса Сендай	51
2.2.6. Культивирование ЭСК и ИПСК человека	52
2.2.7. Определение мутаций в линиях ИПСК	53
2.2.8. Измерение пролиферативной активности ИПСК человека	54
2.2.9. Иммуноцитохимический анализ	54
2.2.10. Полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией	55
2.2.11. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека	56
2.2.12. GTG-Дифференциальное окрашивание	57
2.2.13. Формирование и культивирование эмбрионидных телец	57
2.2.14. Спонтанная дифференцировка ИПСК человека	57
2.2.15. Дифференцировка ИПСК в дофаминергические нейроны	58
2.2.16. Проточная цитофлуориметрия	58
2.2.16.1. Окрашивание поверхностных маркеров	58
2.2.16.2. Окрашивание цитоплазматических маркеров и окрашивание для анализа клеточного цикла	59
2.2.17. Измерение выработки дофамина нейронами	60

2.2.18. Полногеномный анализ метилирования ДНК	60
2.2.19. Полногеномный транскриптомный анализ	61
3. Результаты и их обсуждение	62
3.1. Получение, характеристика и сравнительный анализ эффективности репрограммирования фибробластов кожи человека интеграционным и неинтеграционным методами	62
3.2. Изучение влияния интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования на метилирование ДНК в ИПСК человека	76
3.3. Сравнительное исследование условий культивирования фибробластов и ИПСК, полученных от здорового донора и пациентов с БП	79
3.4. Разработка эффективного и воспроизводимого протокола дифференцировки ИПСК в тирозингидроксилаза-положительные нейроны	83
3.5. Изучение эффективности дифференцировки нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с БП	89
3.6. Изучение дифференциальной экспрессии генов в нейрональных производных ИПСК, полученных от пациентов с БП и здорового донора	96
Заключение	104
Выводы	106
Список использованных сокращений	107
Список публикаций по теме диссертации	109
Благодарности	113
Список цитируемой литературы	114
Приложения	135
Приложение 1	135
Приложение 2	138
Приложение 3	140
Приложение 4	143
Приложение 5	147
Приложение 6	149

Приложение 7	150
Приложение 8	152
Приложение 9	155
Приложение 10	157

Введение

Наследственные нейродегенеративные заболевания представляют собой одну из наиболее актуальных проблем современной неврологии и нейробиологии (Иллариошкин С.Н. с сотр., 2003, Thomas B., et al., 2007). Для ряда нейродегенеративных заболеваний созданы трансгенные модели, разрабатываются подходы к генной терапии болезней (Feigin A., et al., 2007; Mochizuki H., 2009). Однако, более детальное изучение закономерностей нейродегенерации требует разработки адекватных клеточных моделей, наиболее полно воспроизводящих генетические особенности патологического процесса. Изучение функций генов, а также разработка методов их доставки в клетки позволили разработать технологию генетического репрограммирования - изменения специализации соматической клетки. Например, используя набор генов, кодирующих транскрипционные факторы, поддерживающие плюрипотентное состояние, можно репрограммировать любую клетку взрослого организма, индуцировать в ней плюрипотентность (Takahashi K and Yamanaka S., 2006). Неограниченное время жизни плюрипотентных стволовых клеток в культуре, одновременно с возможностью направленной дифференцировки в любой желаемый тип клеток, позволяют сегодня разрабатывать интересные модельные системы, в том числе клеточные модели наследственных заболеваний (Богомазова А.Н. с сотр., 2015). Сочетание методов репрограммирования и направленной дифференцировки предоставляет уникальную возможность для создания и тестирования новых терапевтических средств. Не случайно именно за работы по репрограммированию соматических клеток Дж. Гердону и Ш. Яманака была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2012 г.

Исследование культур нейронов, получаемых путем направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с известными генетическими мутациями, а также от носителей спорадических форм болезни, позволит оценить взаимосвязь между дегенеративными изменениями и характером клинического синдрома. Такие культуры могут также служить уникальной моделью для тестирования различных соединений на нейропротекторную активность и использоваться для мониторинга нейродегенеративных изменений на фоне тех или иных терапевтических вмешательств (Лебедева О.С. с сотр., 2011, Maskay-Sim A., 2013). Исследования молекулярно-генетических и клеточных механизмов репрограммирования и дифференцировки клеток человека имеют большое значение как для фундаментальной науки, так и, в перспективе, для развития клеточной терапии (Рисунок 1).

Получение и перспективы использования ИПСК



Рисунок 1.Получение и перспективы использования ИПСК в лабораторной и медицинской практике (Лебедева О.С. с сотр., 2012).

Болезнь Паркинсона (БП) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием. БП развивается в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции. Медикаментозные методы лечения могут лишь замедлить развитие заболевания, но не излечить его. БП может быть вызвана как факторами внешней среды, так и наследственными факторами. Известны гены, мутации в которых вызывают БП (Drouin-Ouellet J. et al., 2012; Sudhaman S. et al., 2016).

Изучение патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в том числе БП, и скрининг потенциальных лекарственных препаратов требует наличия адекватной модели заболевания. Работа с материалом пациентов ограничена только постмортальными образцами мозга. Осуществлять скрининг и проверку новых лекарственных препаратов на животных возможно, но этот способ имеет ограничения, так как некоторые вещества метаболизируются организмом животного по путям, отличным от человеческого организма. Лабораторные животные не страдают многими нейродегенеративными заболеваниями, в том числе и БП. В этом случае поражение специфического типа нервных клеток индуцируется введением химических веществ

или повышенной экспрессией мутантного гена, с которым связывают развитие болезни. Модель, основанная на таком нефизиологическом пути индукции БП у лабораторного животного, не всегда может адекватно воспроизводить симптомы заболевания и, таким образом, затруднять изучение патогенеза болезни.

Решением данной проблемы может быть создание модели заболевания на основе ИПСК, несущих мутации, связанные с развитием БП, из материала пациентов с установленным диагнозом. ИПСК являются практически бесконечным источником клеточного материала и могут быть дифференцированы в любой тип клеток взрослого организма, в том числе в нейрональные предшественники и дофаминергические нейроны. Разработка такой модели БП позволит изучать функции продуктов мутантных генов в клетке и механизмы развития заболевания. Дифференцированные производные ИПСК могут быть также использованы для скрининга новых лекарственных препаратов.

Целью настоящей работы являлось обоснование возможности использования культур клеток, полученных из ИПСК пациентов, страдающих БП, и дифференцированных в нейрональном направлении, для изучения функций генов, ассоциированных с патогенезом этого заболевания.

В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить ИПСК от пациентов с БП и от здоровых доноров с помощью интегрирующих и неинтегрирующих вирусных векторов, несущих гены репрограммирования Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, и охарактеризовать полученные клетки молекулярно-генетическими методами и с помощью функционального теста.
2. Изучить влияние интеграционного и неинтеграционного способа доставки генов репрограммирования на метилирование ДНК в репрограммированных пациент-специфических клетках на полногеномном уровне.
3. Разработать эффективный и воспроизводимый протокол дифференцировки ИПСК человека в тирозингидроксилаза-положительные постмитотические нейроны.
4. Изучить влияние мутаций в генах *PARK2* и *PARK8* на поведение клеточных культур на разных стадиях дифференцировки и на транскриптом постмитотических нейронов *in vitro*.

Научная новизна и значимость работы

В ходе работы впервые в России были получены линии пациент-специфичных ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*. Проведено изучение влияния интеграционного и неинтеграционного метода репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК на полногеномном уровне. Проведенный анализ впервые продемонстрировал отсутствие достоверных различий между способами доставки репрограммирующих факторов в фибробласты кожи человека.

Разработан эффективный и воспроизводимый протокол нейрональной дифференцировки ИПСК, который позволяет получать культуру постмитотических нейронов, более чем на 80% состоящую из тирозингидроксилаза - положительных клеток.

При транскриптомном анализе дифференцированных ТН-положительных нейронов были показаны специфические для генов *PARK2* и *PARK8* различия в таких клеточных процессах, как развитие нейронов, синтез нейромедиаторов, функционирование фагосом и лизосом, деление клетки и клеточный цикл, функционирование митохондрий, гликолиз. Таким образом, впервые разработаны системы для изучения функции генов *PARK2* и *PARK8*, позволяющие моделировать развитие патогенеза БП *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Использование технологии генетического репрограммирования позволило научно обосновать, что полученные пациент-специфичные нейроны на транскриптомном уровне проявляют мутантный фенотип *in vitro*. Таким образом, создана система, позволяющая изучать как индивидуальные особенности патологии, так и общие для разных генотипов черты. Высокий процент ТН - положительных клеток и наличие в клетках мутаций, связанных с развитием БП делает полученную культуру нейронов подходящей для использования в качестве модельной системы для изучения молекулярных и клеточных механизмов развития заболевания, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Разработанная методика дифференцировки и ее модификации являются предметом патентной заявки. Простота и воспроизводимость протоколов цитофлуориметрического анализа позволяет широко использовать их в клинической практике персоналом любой квалификации. Возможность получения ИПСК неинтеграционным методом в будущем может быть использована в целях клеточной терапии различных заболеваний человека.

Методология и методы исследования

В ходе настоящей работы были получены ИПСК из фибробластов кожи здоровых доноров и пациентов с наследственными формами БП с применением двух методов вирусной доставки генов транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус (лентивирусная инфекция и инфекция вирусом Сендай). Методами ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического окрашивания в полученных линиях ИПСК была показана экспрессия генов, характерных для плюрипотентного состояния. Методом спонтанной дифференцировки через стадию эмбрионидных тел с последующим иммуноцитохимическим окрашиванием дифференцированных клеток на маркеры трех зародышевых листков была подтверждена плюрипотентность полученных ИПСК на функциональном уровне.

Паттерн метилирования ДНК в клонах ИПСК, полученных от одного донора интеграционным и неинтеграционным методами сравнивали методом полногеномного метиломного анализа.

Высокоэффективный протокол направленной нейрональной дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны был модифицирован и адаптирован в целях повышения эффективности дифференцировки и снижения стоимости. В полученных нейрональных культурах методами ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического окрашивания была показана экспрессия маркеров специфического типа нейронов и зрелости нейронов. Эффективность дифференцировки определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с окраской на общенейрональные маркеры (CD56 и CD24) и тирозингидроксилазу. Постмитотический статус нейронов определяли методом анализа клеточного цикла на проточном цитофлуориметре. Данные полногеномного транскриптомного анализа таких нейрональных культур анализировали с помощью программ GenomeStudio и WebGestalt.

Положения, выносимые на защиту

- Линии ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*, не отличаются от ИПСК без мутаций по морфологии, пролиферативной активности, уровню экспрессии основных генов плюрипотентного состояния и способности дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.

- Метод получения ИПСК (интеграционный и неинтеграционный) не оказывает влияния на полногеномный паттерн метилирования ДНК в клетках, полученных от одного донора.
- Разработанный протокол направленной дифференцировки ИПСК в нейрональном направлении позволяет получать культуры постмитотических нейронов на 70-90% состоящие из тирозингидроксилаза – положительных клеток, способных к секреции дофамина.
- Наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными генами при БП являются группы генов, ответственные за метаболические пути, связанные с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом.

Апробация результатов работы

Автором опубликовано 12 печатных научных работ, в том числе 7 статей по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации.

Результаты проведенных исследований были представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на 10 ежегодной встрече Международного Общества Исследователей Стволовых Клеток (ISSCR 10th Annual meeting, Yokohama, Japan) в 2012г.; на VIII Международной конференции “Молекулярная генетика соматических клеток”, Звенигород, Россия, 2011г.; на III конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты», Москва 2011г.; на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды», Петрозаводск, 2011г.; на симпозиуме Международного Общества Исследователей Стволовых Клеток “Stem Cell Models of Neural Regeneration and Disease”, Дрезден, Германия, 2016г.; на конференции «Cell Technologies at the Edge: Research and Practice (CTERP), Санкт-Петербург, Россия, 2016г.

1. Обзор литературы

1.1 Репрограммирование и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

1.1.1. Понятие репрограммирования, методы репрограммирования.

Начиная с самых ранних этапов развития организма, клетки в процессе онтогенеза приобретают всё больше черт терминальной дифференцировки и постепенно теряют способность к дифференцировке в разные специализированные типы клеток. В норме развитие (онтогенез) - это однонаправленный процесс: любая дифференцированная клетка не возвращается назад, не становится прогениторной или стволовой клеткой.

Однонаправленность дифференцировки заложена в генетической программе, реализуемой в естественных условиях. Однако, существующие патологии, например, рак, говорят о том, что изменение работы генов может перевести клетку в менее дифференцированное состояние. Успехи в расшифровке генома в ходе последних десятилетий, изучение функции многих генов и развитие методов генной инженерии привели к тому, что стало возможно эффективно менять состояние клетки, изменяя ее функции и специализацию. Известны три способа возвращения клетки в плюрипотентное состояние: 1) перенос ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (somatic cell nuclear transfer, SCNT), 2) слияние дифференцированной соматической клетки с плюрипотентной клеткой и 3) генетическое репрограммирование.

В 1950-х годах Briggs и King (Briggs R. and King T.J., 1952; King T.J. and Briggs R., 1955) разработали технологию SCNT (somatic cell nuclear transfer), или клонирования, для изучения возможностей развития ядра, извлеченного из клетки эмбриона лягушки на поздней стадии и головастика. Такое ядро переносили в энуклеированный ооцит лягушки. Эксперименты Briggs и King, а также эксперименты Gurdon (Gurdon J.B., 1962; Gurdon J.B. et al., 1975), показали, что дифференцированные клетки амфибий сохраняют генетическую информацию, необходимую для полноценного развития нового организма (клонирования) лягушки. Основным выводом из этих работ явилось заключение, что развитие организма определяется обратимыми эпигенетическими изменениями, а не необратимыми генетическими изменениями. Эксперименты по клонированию овечки Долли (Wilmut I. et al., 1997) и ряда других млекопитающих из клеток взрослого организма (Hoechedlinger K. and Jaenish R., 2002a; Eggen K. et al., 2004; Li J. et al., 2004; Inoue K. et al., 2005) подтвердили этот вывод. Однако, многие клонированные животные проявляли разной степени фенотипические аномалии и аномалии в экспрессии генов, что свидетельствует о том, что в ходе SCNT эпигенетическое репрограммирование генома дифференцированной клетки происходит не полностью

(Wakayama T. and Yanagimachi R., 1999; Hochedlinger K. and Jaenisch R., 2002b; Humpherys D. et al., 2002; Ogonuki N. et al., 2002; Tamashiro K.L. et al., 2002; Gurdon J.B. et al., 2003). Дальнейшее развитие технологии SCNT позволило преодолеть эти проблемы (Khoda T. et al., 2012).

Следующим большим шагом биологии развития стало установление линий иммортализованных плюрипотентных клеток из тератокарцином (опухолей, происходящих из герминальных клеток). Такие клетки были названы клетками эмбриональной карциномы (Stevens L.C. and Little C.C., 1954; Kleinsmith L.J. and Pierce G.B., 1964) и могли культивироваться *in vitro*, сохраняя плюрипотентность (Finch B.W. and Ephrussi B., 1967; Kahan B.W. and Ephrussi B., 1970). При слиянии клеток эмбриональной карциномы с соматическими клетками, например, тимоцитами, получавшийся гибрид приобретал биохимические и функциональные свойства клеток эмбриональной карциномы, полностью лишаясь свойств исходных соматических клеток (Miller R.A. and Ruddle F.H., 1976, 1977). Доминирование плюрипотентного статуса над соматическим статусом в гибридах свидетельствовало о наличии в плюрипотентных клетках каких-то растворимых факторов, которые изменяли состояние ядра соматической клетки.

В 2006 году эти транс-действующие факторы были определены. Японские исследователи сообщили о получении с помощью трансдукции нескольких транскрипционных факторов из терминально дифференцированных клеток (фибробластов мыши) клеточных линий, обладающих свойством плюрипотентности (Takahashi K. and Yamanaka S., 2006). Это стало одним из наиболее существенных достижений биологии развития последних десятилетий и явило собой начало новой эры исследований. Предпосылками к данному открытию послужило развитие методов получения и культивирования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши и человека (Evans M.J. et al., 1981; Thomson J.A. et al., 1998).

Технология репрограммирования оказалась столь универсальной, что позволила получать плюрипотентные клетки не только из различных типов клеток, включая фибробласты кожи, клетки крови (Hanna J. et al., 2008), нервные клетки (Kim J.B. et al., 2008), эндотелиальные клетки (Шутова М.В. с сотр., 2009), но и из клеток различных организмов: крысы (Liao J. et al., 2009), свиньи (Wu Z. et al., 2009) и других животных.

1.1.1.1. Генетическое репрограммирование. Гены, участвующие в репрограммировании

В пионерской работе Takahashi K. и Yamanaka S. были выбраны 24 гена, экспрессия которых коррелирует с плюрипотентным состоянием ЭСК мыши, и проведен их функциональный скрининг. Фибробласты мыши трансфецировали различными комбинациями выбранных факторов, уменьшая количество факторов при ко-трансфекции в поисках минимально необходимого набора генов для репрограммирования. Оказалось, что сочетание транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус при их ретровирусной доставке в соматические клетки приводит к возвращению дифференцированной клетки в плюрипотентное состояние (Takahashi K. et al., 2006). Этот процесс получил название прямого генетического репрограммирования, а сами репрограммированные клетки получили название induced pluripotent stem cells (IPSCs) или, по-русски, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Позднее для индукции плюрипотентности был применен другой набор транскрипционных факторов: Oct4, Sox2, Nanog и LIN28 (Yu J. et al., 2007).

Наряду с транскрипционными факторами, участвующими в поддержании плюрипотентного состояния, в состав обеих комбинаций репрограммирующих факторов входят также гены, играющие большую роль в регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптозе.

Транскрипционный фактор Oct4 (Oct3, OTF3/4 или POU5F1) - ключевой фактор плюрипотентности, кодируется геном Pou5f1 (Takeda J. et al., 1992). Этот фактор необходим для самообновления плюрипотентных клеток, любое изменение в его экспрессии приводит к потере «стволовости» (Zaehres H. et al., 2005). Так, эмбрионы мыши, у которых отсутствует ген, кодирующий Oct4, не формируют клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, все клетки в этом случае превращаются в трофэктодерму (Pesce M. et al, 2001). «Нокдаун» Oct4 методом РНК-интерференции приводит к дифференцировке ЭСК человека с образованием клеток трофобласта, а повышенная экспрессия - к дифференцировке ЭСК в экстраэмбриональную эндодерму (Hay D.C. et al., 2004). Oct4 может образовывать гетеродимеры с транскрипционным фактором Sox2 (Remenyi A. et al., 2003; Brandenberger R. et al., 2005). Гетеродимеризация осуществляется через ДНК-связывающие домены белков при их связывании с ДНК (Remenyi A. et al., 2003). Sox2 - транскрипционный фактор, содержащий HMG-боксы; уровень его экспрессии очень высок в плюрипотентных клеточных линиях эмбриона на ранних стадиях развития, он экспрессируется в эмбриональных и экстраэмбриональных тканях зародыша, в клетках-предшественниках нейральных клеток, участвует в поддержании плюрипотентного

состояния ЭСК наравне с Oct4. Экспрессия транскрипционных факторов Oct4 и Sox2 регулируется протоонкогеном Klf4, который опосредованно участвует в поддержании плюрипотентности (Jiang J. et al., 2008). Также фактор Oct4 осуществляет регуляцию собственного гена в составе комплекса транскрипционных факторов Sox2/Oct4/Nanog. Сочетание этих факторов активирует и ген *Nanog* (Sharov A.A. et al., 2008), экспрессия которого характерна для недифференцированных клеток (Hatanano S.Y. et al., 2005). *Nanog* функционирует в клетке в виде гомодимера. Его повышенная экспрессия в ЭСК мыши способствует сохранению их недифференцированного состояния даже в отсутствие фактора LIF (Wang J. et al., 2008). В дальнейшем было показано, что с комплексом Sox2/Oct4/Nanog может взаимодействовать четвёртый транскрипционный фактор c-Мус (Chickarmane V. et al., 2006; Medeiros R.B. et al., 2009). Такой комплекс активирует большое число генов, в том числе и гены Oct4, *Nanog* и c-Мус (Medeiros R.B. et al., 2009). Экспрессия одного из важнейших генов поддержания плюрипотентности Oct4 регулируется и на посттранскрипционном уровне с помощью белка LIN28, который связывается с кодирующей последовательностью мРНК Oct4 и увеличивает экспрессию ее белкового продукта (Qiu C. et al., 2009). В ЭСК мыши репрессия LIN28 приводит к ослаблению пролиферации, а повышенная экспрессия этого белка – усиливает пролиферацию клеток (Xu B. et al., 2009). Транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус, *Nanog* и LIN28 формируют сеть взаимодействий, необходимых для поддержания самообновления и плюрипотентности ЭСК. Именно эти факторы при введении их в дифференцированные соматические клетки позволяют вернуть им недифференцированное плюрипотентное состояние.

1.1.2. Интеграционные и неинтеграционные методы генетического репрограммирования

Для доставки генов транскрипционных факторов в клетки сначала использовались методы ретровирусной и лентивирусной трансфекции (Takahashi K. et al., 2006, Yu J. et al., 2007).

Лентивирусы относятся к семейству Retroviridae. Лентивирусы способны доставлять значительное количество генетического материала в клетку хозяина и обладают способностью реплицироваться в неделящихся клетках, что делает лентивирусы удобным вектором для доставки генетического материала в клеточной биологии. Роль генетического материала у лентивирусов выполняет «+» РНК. На первом этапе вирусы адсорбируются на

специфических мембранных рецепторов клетки и проникают в цитоплазму (Рисунок 2), где при участии обратной транскриптазы на матрице вирусной РНК образуется двухцепочечная ДНК, называемая провирусом. Затем провирус переходит в ядро, встраивается в геном клетки-хозяина и может сохраняться в таком состоянии в течение длительного времени. На втором этапе происходит синтез и процессинг вирусных мРНК и белков при участии структур клетки-хозяина, что тоже во многом контролируется продуктами вирусных генов. В дальнейшем происходит сборка вирусов и выход их из клетки путем отпочковывания; при этом белки клеточной мембраны могут включаться в состав внешней оболочки вирусов. Удалить вирусный геном из генома зараженной клетки невозможно.

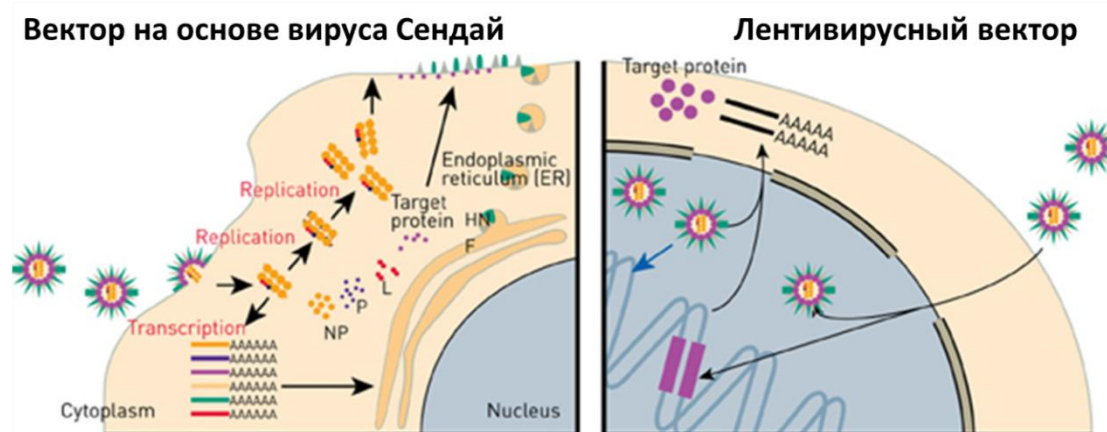


Рисунок 2. Схема работы неинтегрирующегося вирусного вектора (на основе вируса Сендай) в сравнении с интегрирующимся вирусным вектором (на основе лентивируса) (www.lifetechnologies.com).

При использовании лентивируса в качестве вектора для доставки генетического материала в клетку, из генома вируса удаляют гены, продукты которых необходимы для сбора вириона, таким образом, размножение вируса после заражения клетки-мишени оказывается невозможным.

Получение ИПСК с помощью доставки репрограммирующих факторов в лентивирусных векторах получило широкое применение в лабораторной практике в виду высокой эффективности (Таблица 1), методологической простоты и дешевизны (Takahashi K. et al., 2007; Wernig M. et al., 2008; Шутова с сотр., 2009; Brambrink T. et al., 2008). Однако, клетки, несущие в своем геноме вирусные вставки, потенциально опасны из-за возможности активации протоонкогенов в организме пациента, что, в свою очередь, может привести к развитию

злокачественных заболеваний (Thrasher A.J. et al., 2006). Чтобы сделать ИПСК безопасными для применения в медицине, предстояло преодолеть проблемы геномной интеграции и неполного замолкания трансгенных факторов репрограммирования, возникающие при использовании ретро- и лентивирусов. Стали разрабатываться неинтеграционные методы индукции плюрипотентности: piggyBac транспозон, несущий транскрипционные факторы Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, слитые через 2A пептиды (Kaji K. et al., 2009), плазмидные ДНК (Okita K. et al., 2008), рекомбинантные транскрипционные факторы (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) (Zhou H. et al., 2009), мРНК репрограммирующих факторов (Warren L. et al., 2010).

Таблица 1

Эффективность репрограммирования с помощью различных методов.

Способ доставки факторов репрограммирования	Эффективность репрограммирования (%)	Источник
Лентивирусная трансфекция	0,02-0,2	(Yu J. et al., 2007) (Brambrink T. et al., 2008)
Ретровирусная трансфекция	0,1	(Takahashi K. et al., 2007)
Система транспозон-транспозаза	0,1 (4 фактора*) 1 (6 факторов**)	(Yu J. et al., 2009)
Плазмидные ДНК	0,0001-0,003	(Okita K. et al, 2008)
Рекомбинантные белки	0,006	(Zhou H. et al, 2009)
мРНК	1	(Warren L. et al, 2010)
Вирус Сендай	0,2-1 (1% - при репрограммировании линии, несущей в геноме вставку c-Myc)	(Fusaki N. et al., 2009)
Малые молекулы	0,2	(Hou P. et al., 2013)

*- Oct4, Sox2, Nanog, LIN28

** - Oct4, Sox2, Nanog, LIN28, Klf4, c-Myc

Метод, исключаящий появление нежелательных модификаций в геноме, был разработан на основе вектора, выделенного из РНК-содержащего вируса Сендай (семейство парамиксовирусов). Вирус был описан в 1950-х годах в Японии и сразу же занял важное место

в лабораторной практике, как в качестве инструмента исследований, так и в области прикладной биологии (Kuroya M., et al., 1953). Геном вируса Сендай представлен «–» РНК, т.е. он активен исключительно в цитоплазме и не проходит в своей репликации через стадию ДНК (Рисунок 2), что исключает вероятность изменения хромосом клеток-хозяев (Fusaki N. et al., 2009). Вирус не является туморогенным, не относится к патогенам человека и способен заражать широкий набор типов клеток, что делает его безопасным для применения не только в лабораторной практике, но и в клинике. Векторы, основанные на вирусе Сендай, уже использовались как безопасные методы в генной терапии циститного фиброза и для доставки вакцин (Takeda A. et al., 2008; Yonemitsu Y. et al., 2000). Из генома вирусов, используемых в качестве векторов для доставки репрограммирующих факторов, исключены гены белков F, M и НМ, участвующих в формировании оболочки вириона (F и НМ) и матрикса, соединяющего нуклеокапсид вируса с оболочкой, таким образом, размножение вируса после заражения целевой клетки невозможно (Nishimura K. et al., 2011). В последнее время появились коммерчески доступные наборы для репрограммирования соматических клеток, которые представляют собой векторы на основе вируса Сендай, несущие факторы коктейля Яманака. Новейшим предложением являются аналогичные полицистронные векторы, благодаря которым можно увеличить эффективность репрограммирования до 1,2% (<http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/life-science/stem-cell-research/induced-pluripotent-stem-cells/sendai-virus-reprogramming.html>). Однако, высокая стоимость подобных наборов затрудняет их широкое применение в рутинной лабораторной практике.

Как видно из Таблицы 1, процесс репрограммирования в принципе является низкоэффективным (не выше 1%). С момента первого применения технология репрограммирования претерпела множество изменений и дополнений, главным образом, в связи с низкой эффективностью процесса и совершенствованием протокола для потенциального клинического применения ИПСК. Была продемонстрирована способность ряда низкомолекулярных соединений (так называемых «малых молекул») повышать эффективность и качество репрограммирования. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз (5-азациитидин) (Christman J., 2002), деацетилаз гистонов (VPA) (Huangfu D. et al., 2008a) и метилтрансфераз гистонов (BIX 01294) (Shi Y. et al., 2008a) повышают эффективность репрограммирования в несколько раз, так как репрограммирование связано с эпигенетическими перестройками в соматических клетках. Так, репрограммирование с помощью рекомбинантных белков не происходит в отсутствие VPA (Zhou H. et al., 2009). Известно также, что эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши можно повысить с помощью малой молекулы Bayk8644, которая является антагонистом кальциевых каналов L-типа (Shi Y. et al., 2008b). Некоторые малые молекулы

способны заменять факторы репрограммирования. Так, при репрограммировании фибробластов мыши соединение кенполона замещает Klf4 и обеспечивает индукцию Nanog и получение полноценных ИПСК в присутствии лишь трех транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, c-Myc) (Lyssiotis C.A. et al., 2009). Комбинация двух малых молекул VIX01294 и Bayk8644 позволяет осуществлять репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши с помощью только двух транскрипционных факторов Oct4 и Klf4 (Shi Y. et al., 2008б). Фибробласты человека можно вернуть в эмбриональное состояние с помощью транскрипционных факторов Oct4 и Sox2 в присутствии VPA (Huangfu D. et al., 2008б).

Перед научным сообществом встал вопрос: можно ли заменить все факторы индукции плюрипотентности малыми молекулами? В 2013 году был получен положительный ответ. Ноу Р. с соавторами (Ноу Р. et al., 2013) удалось репрограммировать эмбриональные фибробласты мыши до плюрипотентного состояния с использованием только малых молекул. Авторы избежали введения в клетки факторов репрограммирования как таковых при помощи использования трех-стадийного протокола с применением 7 малых молекул. Протокол занимает 35-47 дней. Очевидным продолжением такой знаковой работы должно явиться репрограммирование соматических клеток человека до плюрипотентного состояния с использованием только малых молекул. К сожалению, о репрограммировании клеток человека по описанному протоколу в научной литературе пока не сообщалось.

Несмотря на разнообразие интеграционных и неинтеграционных методов репрограммирования и на широкий круг типов клеток, подвергшихся репрограммированию, получаемый в итоге клеточный продукт должен быть стандартным и не отличаться от лаборатории к лаборатории. Особенно это касается ИПСК, применяемых для терапевтических целей. Любые ИПСК, независимо от того, каким методом они были получены, должны соответствовать общепринятым мировым стандартам, т.е. пройти тесты на плюрипотентность и соответствовать своему «золотому стандарту» - ЭСК.

1.1.3. Характерные особенности ИПСК

1.1.3.1. Морфологические характеристики ИПСК человека

Недифференцированное состояние плюрипотентных клеток характеризуется различными признаками. ИПСК имеют характерную морфологию клетки и колонии. Плюрипотентные клетки человека значительно отличаются от плюрипотентных клеток мыши.

ЭСК мыши образуют округлые многослойные колонии с ровным краем при росте на подложке из желатина. Колонии ИПСК и ЭСК человека плоские и тоже имеют ровный край. Клетки внутри колонии связаны плотными контактами. Для ИПСК и ЭСК характерно высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, т.е. крупное ядро и небольшой объем цитоплазмы (Рисунок 3). Именно на основе морфологического критерия производят отбор репрограммированных клонов при получении ИПСК.

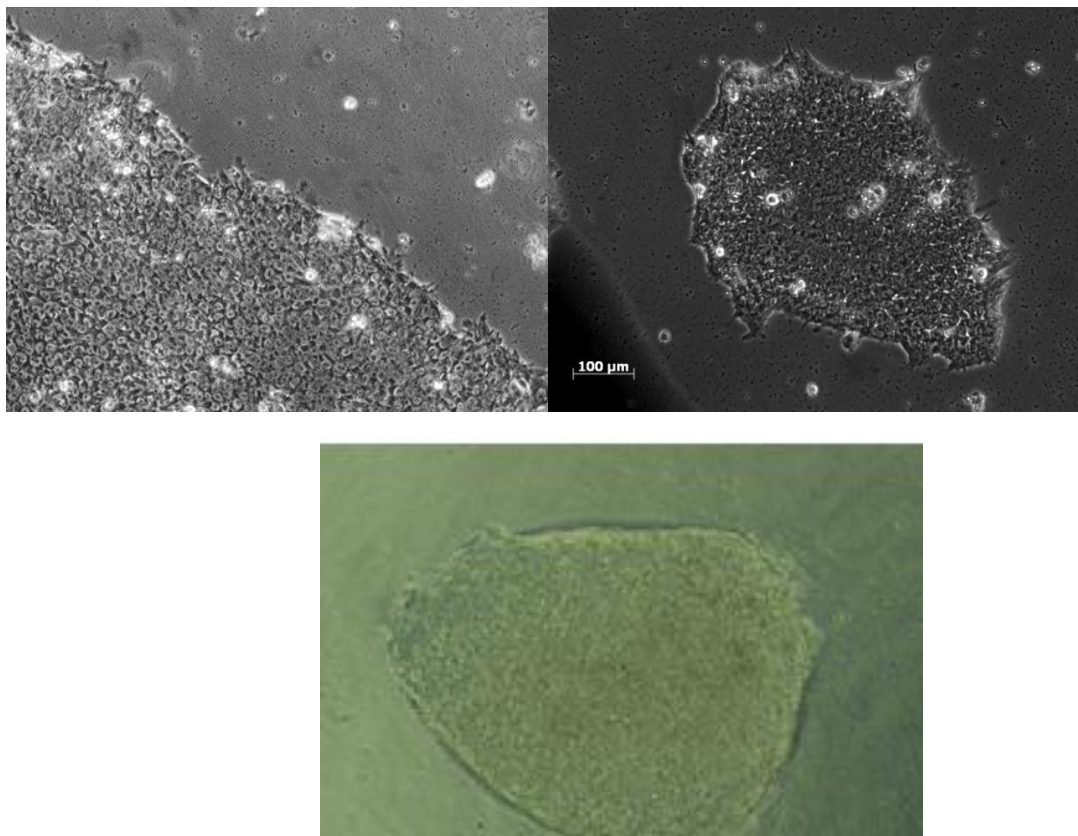


Рисунок 3. Морфология колоний ИПСК человека в сравнении с ЭСК человека и ЭСК мыши. Слева сверху – ИПСК линии IPSRG2L, полученные из фибробластов кожи здорового донора; справа сверху – ЭСК человека, линия ES5; внизу – ЭСК мыши (Lee K.-H. 2013). Увеличение X100.

1.1.3.2. Молекулярные характеристики ИПСК

Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки человека характеризуются высокой активностью щелочной фосфатазы (Takahashi K. et al., 2007), экспрессией

протеогликанов TRA-1-60 и TRA-1-81 (Lowry W.E. et al., 2008) и гликолипида SSEA-4 и в меньшей степени гликолипида SSEA-3 (Park I.-H. et al., 2008). SSEA-4 и SSEA-3 характерны только для плюрипотентных клеток человека и приматов, ЭСК и ИПСК мыши несут на своей поверхности только гликопротеин SSEA-1 (Takahashi K. et al., 2006).

Внутриклеточными маркерами недифференцированного состояния являются транскрипционные факторы, необходимые для поддержания плюрипотентности ИПСК и ЭСК, такие как Oct4, Nanog и Sox2 (Maherali N. et al., 2007; Yu J. et al., 2007; Brambrink T. et al., 2008).

1.1.3.3. Сходство ИПСК и ЭСК человека по паттернам экспрессии генов и метилирования ДНК

Сравнительный анализ изогенных линий ЭСК и ИПСК мыши по паттернам экспрессии генов и метилирования ДНК показал, что изученные линии практически идентичны (Stadtfeld M. et al., 2010). Однако, линии ИПСК человека не имеют изогенной им линии ЭСК (так как, линии ИПСК получают из материала взрослых доноров), кроме того, в разных лабораториях протоколы получения и культивирования ИПСК немного отличаются, что приводит к гетерогенности линий ИПСК (Boué, S. et al., 2010). При использовании вирусных или невирусных интегрирующихся в геном векторов полученные линии ИПСК неизбежно будут гетерогенными, так как каждая из них содержит определенный набор случайным образом распределенных трансгенных вставок (Yao S. et al., 2004), затрудняя сравнительный геномный анализ и ограничивая их использование в терапевтических целях.

Качество линий ИПСК человека можно оценить путем полногеномного сравнения ИПСК с «золотым стандартом» плюрипотентности - с ЭСК. В целом свойства ИПСК соответствуют свойствам ЭСК. Однако при более тонком анализе были показаны различия в паттернах экспрессии и метилировании промоторов разнообразных генов между ЭСК и ИПСК (Lister R. et al., 2011). Частично такие различия объясняли "недорепрограммированным" статусом получаемых ИПСК, из-за которого в части клонов продолжалась экспрессия генов дифференцированных соматических клеток, из которых получали ИПСК, т.н. "соматическая память". Эти различия можно объяснить также не снятием метилирования импринтированных участков во время репрограммирования, или, наоборот, недостаточным метилированием промоторов генов, экспрессия которых характерна для соответствующего типа дифференцированных клеток. Однако часть различий невозможно было объяснить, и их списывали на генетические различия линий ЭСК и ИПСК или вклад самого процесса

репрограммирования. И действительно, сравнительный анализ статей, посвященных поиску отличий между ЭСК и ИПСК, показывает, что специфические маркеры репрограммированных клеток были найдены только в статьях, в которых было проведено сравнение небольшого количества линий ЭСК и ИПСК. Если же сравнить данные по анализу уровня метилирования ДНК и транскриптома для большого количества линий ЭСК и ИПСК, полученных в разных лабораториях из разных типов клеток, то они представляют собой два пересекающихся множества (Bock C. et al., 2011; Nazor K.L. et al., 2012). Последние опубликованные работы говорят о том, что в рамках существующих возможностей полногеномного анализа при сравнении ЭСК и ИПСК, невозможно увидеть следы, оставленные процессом репрограммирования и отделить их от изначальных генетических различий этих линий. Однако для применения конкретных линий ИПСК для терапии необходимо знать, насколько они похожи на плюрипотентные стволовые клетки пациента, из клеток которого получены ИПСК. Для осуществления такого сравнения необходимо прямое сравнение изогенных линий ЭСК и ИПСК.

В опубликованных работах по сравнению изогенных ЭСК и ИПСК мыши и почти изогенных ЭСК и ИПСК человека отмечена дисрегуляция импринтированных генов (в частности, Dlk1-Dio3 кластера), а также генов, находящихся на X-хромосоме. Однако в работах также отмечается большая вариабельность между получаемыми линиями ИПСК, которая не позволяет говорить о найденных различиях в метилировании между отдельными линиями ЭСК и ИПСК как о прямых последствиях репрограммирования, а также оценить вклад соматических клеток. Более того, существуют генетические и эпигенетические различия между различными линиями ЭСК, которые хоть и соответствуют вариациям между отдельными индивидуумами, но, тем не менее, усложняют сравнение с ИПСК. Также, пока нет молекулярно-биологического объяснения различий между изогенными ЭСК и ИПСК, которое может связать эти различия с репрограммированием (Богомазова А.Н. с сотр., 2015).

Таким образом, можно заключить, что ИПСК обладают всеми свойствами ЭСК, включая гетерогенность между разными линиями.

1.1.3.4. Метилирование ДНК в процессе репрограммирования

Метилирование ДНК – модификация ДНК, о которой раньше других стало известно, что она коррелирует с репрессией генов (Razin A. and Riggs A.D., 1980). В той или иной степени оно имеет место у всех эукариот, за исключением дрожжей. Эта модификация заключается в

добавлении метильной группы к цитозиновым остаткам матрицы ДНК. У млекопитающих она происходит по динуклеотидам 5'СрG3'. Распределение метилированной ДНК по геному показывает ее повышенное содержание в некодирующих районах (например, в центромерном хроматине) и в рассеянных повторяющихся элементах (транспозонах), но не в островках СрG активных генов (Bird A.P., 1986). Одной из функций метилирования ДНК является подавление значительной части генома чужеродного происхождения (т.е. реплицированные мобильные элементы, вирусные последовательности и другие повторяющиеся последовательности) (Эллис С.Д. с соавт., 2010).

У млекопитающих паттерны метилирования устанавливаются в ходе эмбрионального развития и поддерживаются механизмом копирования при делении клеток. Большинство генов млекопитающих (около 60%) имеют в своих промоторных областях группы повторяющихся нуклеотидов С и G, получившие название СрG островков, метилирование которых отличается от метилирования гетерохроматиновых участках того же нуклеотидного состава (Эллис С.Д. с соавт., 2010).

ДНК-метилтрансферазы (DNMTs) являются «эффекторами» метилирования ДНК и катализируют либо метилирование *de novo*, либо поддержание метилирования полуметилированной ДНК после репликации ДНК. Утрата способности поддерживать метилирование ДНК может приводить к таким заболеваниям, как ICF (Immunodeficiency, Centromeric instability and Facial abnormalities - иммунодефицит, центромерная нестабильность и лицевые аномалии). Дерегуляции в уровнях метилирования ДНК вносят вклад и в прогрессию рака (Эллис С.Д. с соавт., 2010).

Эпигенетическая информация играет большую роль в детерминации и поддержании определенной и стабильной программы экспрессии генов, имеющих решающую роль в клеточной специализации в процессе развития организма. В тотипотентных и плюрипотентных клетках эпигенетические метки менее стабильны и более пластичны. Однако в процессе развития клеточные потенции становятся все более и более ограниченными, а эпигенетические метки все более устойчивыми и ограничительными. Метилирование ДНК постепенно уменьшается с каждым клеточным делением до стадии 16-клеточной морулы. Причина этого заключается в том, что DNMT1, метилтрансфераза, которая полуконсервативно поддерживает метилирование СрG динуклеотидов во время репликации ДНК, исключается из ядра (Carlson L.L. et al., 1992). Возникновение трофэктодермы на стадии бластоцисты является первым событием выделения линии в эмбрионах млекопитающих, трофэктодерма дает начало плаценте. Внутренняя клеточная масса (ВКМ) бластоцисты дает начало всем остальным экстраэмбриональным тканям и тканям взрослого организма, из нее выделяют ЭСК для культивирования *in vitro*. Эпигенетическая регуляция экстраэмбриональных и эмбриональных

тканей различается. Так, общий уровень метилирования ДНК в экстраэмбриональных тканях ниже. Различия наблюдаются также в поддержании импринтинга и инактивации X хромосомы. Клетки ВКМ приобретают более высокий уровень метилирования ДНК за счет работы метилтрансферазы DNMT3B, которая образует сайты метилирования *de novo* (Santos E. et al., 2002). Перед гаструляцией волна глобального метилирования *de novo* устанавливает общую картину метилирования, характерную для взрослого организма и поддерживаемую в дальнейшем в соматических клетках на протяжении всей жизни (Dean W. et al., 2003).

Промоторы генов, связанных с поддержанием плюрипотентности (например, Oct4), гипометилированы в недифференцированных ЭСК и ИПСК и гиперметилированы в их дифференцированных производных и соматических клетках (Hattori N., et al., 2004; Takahashi K., et al., 2006; Hattori N., et al., 2007). При потере клеткой плюрипотентности в ходе дифференцировки или эмбрионального развития промоторы генов поддержания плюрипотентности подвергаются метилированию, которое осуществляется ДНК-метилтрансферазами DNMT1, DNMT3A и DNMT3B (Li J.Y., et al., 2007). В плюрипотентных клетках снижен уровень метилирования промоторов, содержащих CpG-островки, и повышен уровень метилирования промоторов, бедных CpG (Meissner A., et al., 2008).

Представленные данные свидетельствуют о том, что в ходе репрограммирования соматической клетки её эпигенетические характеристики должны кардинальным образом измениться. В работе Planello A.C. с соавторами был поставлен вопрос о влиянии набора репрограммирующих факторов на эпигенетические характеристики получаемых ИПСК. Неонатальные фибробласты крайней плоти от одного донора были инфицированы ретровирусными векторами, несущими разные наборы факторов (факторы Яманака Oct4, Sox2, Klf4, c-Мус; факторы Томсона Oct4, Sox2, Nanog, LIN28). При сравнении метилирования ДНК в линиях ИПСК, полученных с использованием разных наборов репрограммирующих факторов, исходной линии фибробластов и ЭСК было показано, что ИПСК по паттерну метилирования приблизились к ЭСК, но, однако, имели некоторые различия, как между собой, так и с ЭСК (Planello A.C. et al., 2014). Тем не менее, наблюдаемые различия в паттернах метилирования могут быть обусловлены как различиями в генетическом фоне линий ИПСК от разных доноров и линий ЭСК, так и небольшим размером исследованной выборки.

В работе Лагарьковой М.А. с сотрудниками были изучены функциональные и эпигенетические свойства ИПСК, полученных из клеток эндотелия пупочной вены человека методом прямого генетического репрограммирования. Полученные ИПСК не отличались от ЭСК человека по морфологии, экспрессии генов поддержания плюрипотентности и по способности дифференцироваться в производные трех зародышевых листков как *in vitro*, так и

in vivo. ИПСК эффективно дифференцировались в эндотелиальные клетки *in vitro*. При полногеномном анализе метилирования ДНК было показано, что промоторы генов, специфичных для эндотелия, метилировались в ходе репрограммирования, тогда как промоторы генов поддержания плюрипотентности деметилировались до уровня метилирования, характерного для ЭСК человека. Полногеномный метиломный анализ CpG островков, лежащих в функциональных частях 14000 генов, показал, что паттерн метилирования ИПСК очень похож на паттерн метилирования ЭСК, хотя различия в уровнях метилирования 46 генов были обнаружены. В целом метилирование CpG островков в плюрипотентных клетках было выше, чем в соматических. Также было показано, что в ИПСК с генотипом 46 XX произошла частичная реактивация X хромосомы (Lagarkova M.A. et al., 2010).

Аналогичные данные получены при сравнении ИПСК, полученных из клеток назального эпителия, и ЭСК человека. Такие ИПСК экспрессировали маркеры плюрипотентности, дифференцировались в производные трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo*, а также имели транскриптомные и метиломные паттерны, схожие с ЭСК человека. Однако, при метиломном анализе были обнаружены различия между ЭСК и ИПСК. Маркеры метилирования, характерные для эпителия, сохранялись в ИПСК и через несколько пассажей (Ji H. et al., 2015).

Небольшие различия в паттернах метилирования, наблюдаемые при сравнении ИПСК и ЭСК, можно объяснить феноменом «эпигенетической памяти», который состоит в том, что следы модификаций ДНК соматической клетки не полностью стираются при репрограммировании (Sullivan G.J. et al., 2010). Каждый тип клеток в организме имеет специфические эпигенетические характеристики (паттерн метилирования ДНК, посттрансляционные ковалентные модификации гистонов). Выбор исходного типа клеток для репрограммирования влияет на эпигенетические характеристики получаемых линий ИПСК и даже на способность этих линий к дифференцировке. При репрограммировании соматических клеток из разных тканей разных доноров были продемонстрированы различия в метилировании ДНК между линиями ИПСК из различных источников и линиями ЭСК. Был также оценен дифференцировочный потенциал линий ИПСК. Оказалось, что ИПСК с большей эффективностью дифференцируются в тот тип клеток, из которого они были получены. Так при дифференцировке ИПСК, полученных из кератиноцитов крайней плоти, экспрессия кератина 14 в эмбрионидных тельцах была в 9 раз выше, чем в эмбрионидных тельцах, образованных ИПСК, полученными из клеток пуповинной крови. ИПСК из клеток пуповинной крови, в свою очередь, обладали большей потенцией к дифференцировке в гемопоэтическое направление (Kim K. et al., 2011). Однако, при сравнении ИПСК, полученных из стволовых клеток зародышевого пути с помощью экспрессии факторов плюрипотентности, и ИПСК, полученных из тех же клеток с

помощью специальных условий культивирования (Ko K. et al., 2010), было показано, что эпигенетические нарушения при репрограммировании не зависят от способа репрограммирования, т.е. не являются специфическим свойством генетического репрограммирования (Tiemann U. et al., 2015).

Разработанная в отделе эпигенетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова система сравнения изогенных линий ЭСК и ИПСК, полученных из разнообразных дифференцированных производных этой линии ЭСК, позволила провести полногеномное сравнение метилирования и экспрессии линий плюрипотентных клеток. В работе было показано, что не существует генов, по экспрессии которых можно было бы отличить ИПСК человека от изогенных им ЭСК. В целом, полногеномные исследования экспрессии и метилирования генов при репрограммировании указывают, что существующие различия между клонами ИПСК и ЭСК носят случайный характер и нет единого для всех ИПСК набора генов или CpG, по изменению экспрессии или статусу метилирования которых можно было бы отличить линию ИПСК от линии ЭСК. Таким образом, можно заключить, что ИПСК обладают всеми свойствами ЭСК, включая гетерогенность внутри и между разными линиями (Shutova M.V. et al., 2016).

1.1.3.5. Плюрипотентность ИПСК

Для максимальной стандартизации линий ИПСК исследователями была разработана панель анализов, позволяющих показать, что получаемые в лаборатории линии ЭСК и ИПСК человека действительно являются плюрипотентными (Maherali N. and Hochedlinger K., 2008). Такой анализ включает в себя иммуноцитохимическое окрашивание и количественную полимеразную цепную реакцию, сопряженную с обратной транскрипцией, на маркеры плюрипотентности и маркеры всех трех зародышевых листков после образования эмбриоидного тела, и анализ кариотипа методом окрашивания изолированных метафазных хромосом красителем Гимза (G-banding) (Soldner F. et al., 2009). Нормальный набор хромосом в ИПСК - необходимый критерий для обеспечения воспроизводимости и достоверности экспериментов. Кроме того, ИПСК должны быть охарактеризованы по их способности к пролиферации и дифференцировке.

По определению, ИПСК могут дифференцироваться в клетки – производные любой соматической линии, что строго доказывается методом получения химерных животных для

всех ИПСК, кроме ИПСК человека. Наиболее простой способ – агрегация ПСК с эмбрионом на стадии морулы. Химерный эмбрион доращивают до стадии бластоцисты и имплантируют в матку самки-реципиента. Другой вариант – инъекция ПСК в бластоцисту. В обоих случаях развивающееся животное будет состоять как из донорных клеток, так и из клеток реципиента. Донорные клетки принимают участие в формировании всех тканей взрослого организма, но не включаются в экстраэмбриональные ткани (Nagy A. et al., 1990). Позднее был разработан метод тетраплоидной комплементации у мышей (Nagy A. et al., 1993; Zhao X.-Y. et al., 2009). Тетраплоидный эмбрион получают методом электрослияния бластомеров после первого деления зиготы. ПСК агрегируют с тетраплоидными морулами или вводят в бластоцель тетраплоидной бластоцисты. Тетраплоидные клетки образуют экстраэмбриональные ткани, а эмбрион образуется практически полностью из клеток донора, т.к. тетраплоидные клетки медленнее делятся и могут иметь ограниченный потенциал к дифференцировке. Получение целого организма, состоящего из ПСК, можно считать наиболее сильным доказательством дифференцировки. Важно отметить, что ИПСК, полученные из дифференцированных клеток мыши, могут включаться не только в соматические ткани химерного животного, но и образовывать клетки половой линии (Maherali N. et al., 2007; Zhou H. et al., 2009).

Практические и этические проблемы ограничивают проведение функциональных тестов для изучения плюрипотентности клеток человека. Самым простым функциональным тестом на плюрипотентность для ИПСК человека является спонтанная дифференцировка *in vitro*. После культивирования ИПСК человека в отсутствие фидерного слоя из мышинных эмбриональных фибробластов в дифференцировавшихся клетках обнаруживается экспрессия маркеров эндодермы, мезодермы и эктодермы (Sun N. et al., 2009). Единственным возможным для плюрипотентных клеток человека тестом на плюрипотентность *in vivo* является образование тератом при введении их иммунодефицитным (SCID) мышам. В тератомах обнаруживаются такие ткани, как кишечный эпителий (эндодерма); хрящ, кость и гладкие мышцы (мезодерма); нейральный эпителий (ектодерма) (Takahashi K. et al., 2007; Brambrink T. et al., 2008).

1.1.4. Направленная дифференцировка ИПСК в нейроны

При дифференцировке плюрипотентных клеток в любой тип клеток взрослого организма исследователь стремится повторить события, происходящие в ходе эмбриогенеза, а именно – подобрать правильные концентрации факторов роста и дифференцировки, выбрать подходящую подложку для культивирования клеток и подобрать правильную плотность посева клеток

(имитировать механические напряжения, происходящие при развитии эмбриона, и взаимодействия дифференцирующихся клеток со стромой). В настоящее время эмбриогенез нервной системы изучен достаточно хорошо и выявлены факторы, как механические, так и химические, участвующие в каждом этапе нейрогенеза от закладки нервной трубки до появления полностью сформированного функционального мозга. На начальных этапах любой нейрональной дифференцировки стоит задача получения некоммитированных нейральных предшественников, которые являются аналогами клеток нервной пластинки и нервной трубки. На данном этапе дифференцировки очень важную роль играют механические воздействия на клетки. Клетки, находящиеся в середине нервной пластинки, испытывают серьезное механическое давление, вызванное в первую очередь ускорением пролиферации в данной области и увеличением плотности клеток. Происходящее одновременно с этим сворачивание нервной пластинки в нервную трубку подвергает давлению вентральную часть будущей нервной трубки, определяя тем самым судьбу клеток в этом регионе. Клетки, находящиеся на смыкающихся краях нервной трубки, не испытывают на себе давления со стороны соседних тканей, что является определяющим в выборе их судьбы, как клеток нервного гребня (Gilbert S.F., 2003; Stiles J., 2008). Поиск белковых факторов роста и дифференцировки, отвечающих за образование нервной пластинки и нервной трубки начался с изучения эмбриогенеза амфибий, однако процесс оказался весьма консервативным. Как было показано в экспериментах на эмбрионе лягушки ингибитор сигнального каскада BMP - Noggin - является одним из основных индукторов образования нервной пластинки в организаторе Шпемана (Smith W.C. et al., 1992). Низкомолекулярное соединение SB431542 ингибирует сигнальные пути Lefty/Activin/TGF β , блокируя фосфорилирование рецепторов ALK4, ALK5, ALK7 (Smith J.R. et al., 2008). Механизм синергического действия Noggin и SB431542 основан на дестабилизации сигнальной сети, поддерживающей плюрипотентность, в которой участвуют активин и Nanog, ингибировании индуцированной BMP дифференцировки в трофобласт, запрете дифференцировки по мезо- и эндодермальному пути путем ингибирования эндогенных сигналов активина и BMP, нейтрализации примитивной эктодермы с помощью ингибирования BMP. Низкомолекулярное вещество дорсоморфин является ингибитором сигнального пути BMP (Yu P.B., et al., 2008). Использование дорсоморфина позволяет частично заменить дорогостоящий белковый фактор Noggin и увеличить эффективность дифференцировки. Noggin и SB431542 направляют судьбу клеток в сторону передней части нервной трубки, из которой впоследствии разовьются передние отделы центральной нервной системы (ЦНС), что и является первой целью при направленной дифференцировке в дофаминергические нейроны.

В ходе дальнейшего развития нервной трубки происходит ряд событий, ведущих к усложнению её пространственной организации и, соответственно, её клеточного состава. После замыкания нервной трубки начинается активное деление ее клеток, и нервная трубка становится многослойной. Неравномерное деление клеток в передней части нервной трубки приводит к образованию трех мозговых пузырей (Рисунок 4).

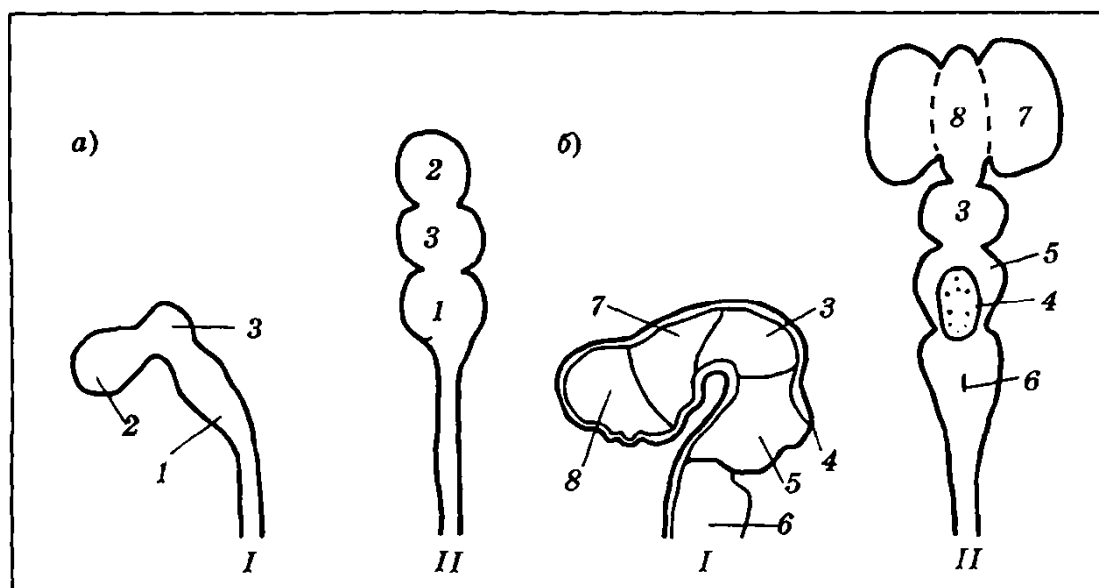


Рисунок 4. Стадии раннего развития головного мозга: а — стадия трех мозговых пузырей; б — стадия пяти мозговых пузырей; I — вид сбоку; II — вид сверху; 1 — задний мозг; 2 — передний мозг; 3 — средний мозг; 4 — мозжечок; 5 — мост; 6 — продолговатый мозг; 7 — промежуточный мозг; 8 — конечный мозг (Н.А. Фонсова, В.А. Дубынин, 2004).

Затем передний и задний мозговые пузыри подразделяются на два вторичных пузыря, таким образом, мозговых пузырей становится пять. Одновременно с разрастанием нервной трубки происходит её изгибание, необходимое для «укладки» будущего мозга в черепной коробке. Неравномерное и быстрое деление клеток переднего мозга приводит к тому, что он, разрастаясь, покрывает собой остальные отделы мозга, и на его поверхности образуются борозды и извилины (Stiles J., 2008). Происходящие в это время процессы регулируются градиентами концентраций факторов роста и дифференцировки, которые опосредуют специализацию клеток нервной системы в отделах мозга. Успех направленной дифференцировки зависит от того, как точно исследователь сможет воспроизвести присутствующие в развивающемся мозге градиенты факторов роста и дифференцировки. За специализацию дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга отвечают

Sonic hedgehog (Shh) и фактор роста фибробластов 8 (FGF8). Shh выделяется донной пластинкой, FGF8 экспрессируется на границе между промежуточным и задним мозгом. FGF8 образует каудо-ростральный градиент, а Shh отвечает за вентрализацию клеток среднего мозга (Gilbert S.F., 2003; Wurst W., Bally-Cuif L., 2001). Shh в культуральной среде можно заменить низкомолекулярным веществом пурморфамином (Li, X.J. et al., 2008). В этом случае концентрацию дорогостоящего рекомбинантного Shh в культуральной среде можно снизить, что представляется значительной экономией.

Разработаны разнообразные протоколы дифференцировки плюрипотентных клеток человека в специфические типы нейронов. Методики дифференцировки могут быть основаны на введении в геном дифференцируемой клетки векторов, несущих гены, ответственные за дифференцировку в искомый тип нейронов. Другие методики основаны на обработке клеток экзогенными факторами роста и дифференцировки в сочетании с условиями культивирования (плотность посева, материал подложки, частота пересева). Протоколы направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны (тип клеток, который повреждается при болезни Паркинсона) являются одними из наиболее детально разработанных.

Одним из наиболее эффективных методов дифференцировки является метод, основанный на введении в геном клетки вектора, несущего ген ответственный за направленную дифференцировку. *Lmx1a* - один из основных транскрипционных факторов, необходимых для дифференцировки дофаминергических нейронов среднего мозга. Введение в геном клетки вектора, экспрессирующего ген *Lmx1a*, позволяет увеличить эффективность дифференцировки плюрипотентных клеток человека в дофаминергические нейроны и получить более гомогенную нейрональную популяцию (Sanchez-Danes A. et al., 2012b). Другим методом повышения эффективности дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны является введение в геном клеток вектора, содержащего флуоресцентный белок под контролем промотора гена *Lmx1a*, что на определенном этапе дифференцировки позволяет отобрать с помощью сортера клеток предшественники дофаминергических нейронов (Nefzger C.N. et al., 2012). Однако, внесение в геном клетки модификаций может привести к злокачественной трансформации клетки в виду повреждения какого-либо важного гена, кроме того, дифференцированные производные этих клеток вряд ли подойдут для клеточной терапии.

Применение экзогенных факторов роста и дифференцировки в виде рекомбинантных белков или низкомолекулярных соединений позволяет избежать этого недостатка. Высокоэффективный протокол дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны был опубликован в 2011 (Kriks S. et al., 2011), он позволяет получать до 80% тирозингидроксилаза-

положительных клеток. Данный протокол основан на четко выверенной по времени обработке клеток рекомбинантными белковыми факторами и низкомолекулярными соединениями, действующими на сигнальные пути, направляющие дифференцировку в дофаминергические нейроны среднего мозга. В протоколе также подробно рассмотрена необходимая плотность посева исходных ИПСК и нейральных предшественников для наиболее эффективной дифференцировки, что играет важную роль в процессе дифференцировки плюрипотентных клеток человека.

Исходя из данных биологии развития и опубликованных в литературе протоколов, можно подобрать оптимальный протокол дифференцировки в искомый тип нейронов. Однако, опираясь на протоколы исследователей из других лабораторий, следует быть внимательным, поскольку в различных лабораториях используют среды и факторы роста и дифференцировки от разных производителей, что может сыграть роль в эффективности дифференцировки и изменить время каждого ее этапа. Многие исследователи сталкивались с тем, что рекомбинантные белки имеют разную активность от лота к лоту, и новый лот зачастую требует дополнительной титровки. Однако, учитывая эти «подводные камни», практически любой протокол направленной дифференцировки можно адаптировать к условиям своей лаборатории, а иногда и улучшить.

1.2 Болезнь Паркинсона

Нейродегенеративные заболевания являются одними из самых тяжелых заболеваний человека, так как радикально снижают уровень жизни больного и разрушают его личность. БП является вторым после болезни Альцгеймера по распространённости хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием. БП – одно из наиболее частых и социально значимых нейродегенеративных заболеваний нервной системы, встречающееся повсеместно. Распространенность БП достигает 250 случаев на 100 000 населения, причем доля заболевших значительно возрастает в старших возрастных группах (до 1–2 % среди лиц старше 60 лет) (Kasten M. et al., 2007). Средний возраст дебюта заболевания - 55 лет. В то же время у 10% больных заболевание дебютирует в молодом возрасте, до 40 лет. Заболеваемость паркинсонизмом не зависит от половой и расовой принадлежности, социального положения и места проживания. На лечение таких пациентов правительство США тратит 6 миллиардов долларов ежегодно. В связи с увеличением среднего возраста популяции в скором времени прогнозируется увеличение числа людей, страдающих болезнью Паркинсона, что повлечет за собой ухудшение здоровья нации и нанесёт ощутимый удар по бюджету.

БП впервые описал английский врач Джеймс Паркинсон в 1817 году в своем "Эссе о дрожательном параличе", в котором обобщил результаты наблюдений за шестью пациентами. Дж. Паркинсон описывал это заболевание как "дрожательный паралич" со следующими характерными проявлениями: "непроизвольные дрожательные движения, ослабление мышечной силы, ограничение активности движений, туловище больного наклонено вперед, ходьба переходит в бег, при этом чувствительность и интеллект больного остаются сохранными". С тех пор БП была детально изучена, конкретизированы все её симптомы, однако портрет заболевания, составленный Дж. Паркинсоном, остается по-прежнему точным и емким.

Из-за медленного течения БП её не всегда диагностируют на ранней стадии. Симптомы БП значительно усиливаются с течением времени. Некоторые люди становятся тяжелыми инвалидами, другие испытывают лишь незначительные двигательные нарушения. Тремор является основным симптомом для некоторых пациентов, в то время как для других тремор - только незначительная жалоба, и другие симптомы приносят больше страданий. Невозможно предсказать, какие симптомы проявятся у конкретного больного, и интенсивность симптомов также варьирует от человека к человеку. Средняя продолжительность жизни пациентов с БП, как правило, такая же, как и у здоровых людей. Тем не менее, на поздних стадиях заболевания, БП может вызвать такие осложнения, как удушье, пневмонии и припадки, что может привести к смерти. Прогрессирование симптомов при БП может занять 20 лет и более. У некоторых людей, однако, болезнь прогрессирует быстрее. На данном этапе нет способа предсказать течение болезни для конкретного человека. Несмотря на наличие различных методов лечения БП, качество жизни пациентов значительно снижается по сравнению со здоровыми людьми.

Основные клинические проявления данного заболевания (брадикинезия, мышечная ригидность, тремор покоя) обусловлены гибелью нейронов черной субстанции среднего мозга, продуцирующих дофамин, и дегенерацией нигростриатного дофаминергического пути (de Lau L.M. et al., 2006 ; Иллариошкин С.Н., 2003; Thomas B. et al., 2007). Дефицит дофамина в нигростриатной системе является ключевым нейромедиаторным нарушением, обуславливающим основные клинические проявления БП. Современные методы лечения данного заболевания, которые по большей части сводятся к коррекции нейромедиаторного дисбаланса в ЦНС с помощью леводопы и других препаратов, позволяют уменьшить выраженность отдельных симптомов и улучшить качество жизни пациентов, однако не предотвращают дальнейшего прогрессирования нейродегенеративного процесса и являются лишь паллиативными (Olanow C.W. et al., 2011).

1.2.1. Патогенез болезни Паркинсона на клеточном уровне

Во время эмбрионального развития дофаминергические нейроны развиваются в области донной пластинки среднего мозга и дают начало трем различным кластерам нейронов, которые, в конечном счете, развиваются в анатомически и функционально различные подтипы дофаминергических нейронов (A8, A9 и A10). Подтип A9 дает начало компактной части черной субстанции. Эти нейроны и их проекции в полосатое тело необходимы для контроля произвольных движений. Подтипы A10 и A8 принимают участие в формировании вентральной части покрышки и ретикулярной субстанции, соответственно (Hegarty S.V. et al., 2013). Клетки, относящиеся к подтипу A10, имеют округлое тело и экспрессируют кальбиндин. Дофаминергические нейроны подтипа A9, напротив, имеют «угловатую» форму сомы, а характерным молекулярным маркером для них является калиевый канал GIRK2 (Thompson L. et al., 2005).

БП развивается в результате прогрессирующей дегенерации дофаминергических пигментных нейронов ряда структур ствола мозга (главным образом компактной части черной субстанции и области голубого пятна), которая сопровождается хронической дисфункцией нигростриального, мезолимбического и мезокортикального дофаминергических путей в ЦНС (Рисунок 5). Нигростриальный дофаминергический путь начинается в нейронах чёрной субстанции (подтип A9 дофаминергических нейронов), аксоны которых через ножку мозга, внутреннюю капсулу, бледный шар доходят до стриатума (полосатого тела). Дегенерация данного пути является основным фактором развития БП. Еще одна восходящая дофаминергическая система — мезолимбический путь. Он начинается от клеток интерпедункулярного ядра среднего мозга и заканчивается в гипоталамусе и лобных долях головного мозга. Этот путь принимает участие в контроле настроения, поведении и контролирует начало двигательного акта и движений аффективной реакции (движений, которые сопровождают эмоции). Кажущийся ограниченным анатомический дефект приводит к глобальным нарушениям работы мозга и, как следствие, всего организма (Иллариошкин С.Н., 2003).

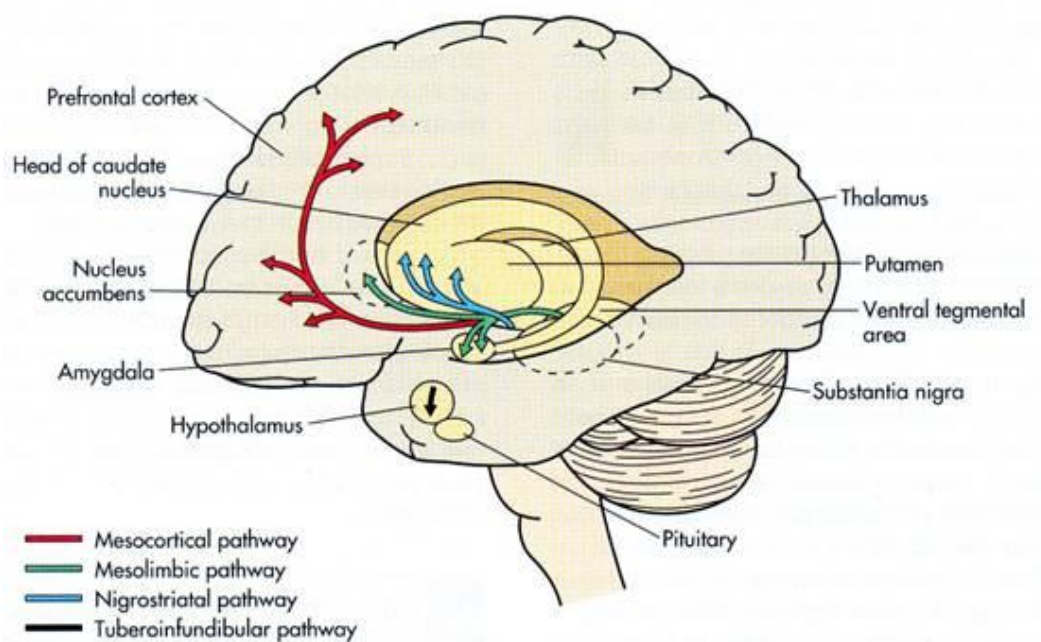


Рисунок 5. Дофаминергические пути в головном мозге. Prefrontal cortex – префронтальная кора, Head of caudate nucleus – головка хвостатого ядра, Nucleus accumbens – сопутствующее ядро, Amygdala – миндалина, Hypothalamus – гипоталамус, Pituitary – гипофиз, Substantia nigra – черная субстанция, Ventral tegmental area – вентральная покрышечная область, Putamen – скорлупа, Thalamus – таламус, Mesocortical pathway – мезокортикальный путь, Mesolimbic pathway – мезолимбический путь, Nigrostriatal pathway – нигростриальный путь, Tuberoinfundibular pathway – тубероинфундибулярный путь. (По Brody T.M. et al., 1998).

Патогенез БП начинается с того, что «пусковые» факторы (факторы среды и/или генетические) инициируют каскад патохимических реакций, ведущих к прогрессирующей дегенерации дофаминергических нейронов. В разных возрастных группах соотношение роли средовых и генетических факторов различно: у молодых пациентов ведущее значение имеет генетическая предрасположенность, тогда как при развитии БП в пожилом возрасте основное значение придается неблагоприятным факторам внешней среды. Пациент начинает ощущать первые симптомы болезни лишь после потери 70% дофаминергических нейронов (что соответствует 80%-ному снижению уровня дофамина в базальных ганглиях). Уменьшение тормозного влияния дофамина на интернейроны стриатума приводит к относительному преобладанию активности холинергических систем мозга. Дополнительное значение имеет эксайтотоксический эффект избытка нейромедиатора глутамата, обусловленный дезинтеграцией стриокортикальных связей вследствие дегенерации дофаминергических нейронов мезокортикального пути (Иллариошкин С.Н., 2004).

При микроскопическом исследовании поражённых областей выявляют уменьшение числа нервных клеток. В оставшихся клетках определяются тельца Леви. Также в поражённых областях наблюдается гибель астроцитов и активация микроглии. Тельца Леви представляют собой агрегаты белка α -синуклеина. Наличие телец Леви — один из признаков болезни Паркинсона, однако специфическим признаком не является, т.к. характерен и для других нейродегенеративных заболеваний (Tolosa E. et al., 2007).

До проявления симптомов БП тельца Леви появляются в нейронах обонятельной луковицы, продолговатого мозга и варолиева моста. При прогрессировании заболевания наличие данных патологических телец отмечается в нейронах чёрной субстанции, среднего мозга и базальных ганглиев, а на конечных этапах в клетках коры головного мозга (Davie C. A. et al., 2008). Значение образования телец Леви для выживания клетки пока не определено.

1.2.2. Причины развития БП

БП может носить как спорадический, так и наследственный характер. Ненаследственные случаи болезни Паркинсона обычно связаны с влиянием условий среды обитания на человека, токсическим или механическим повреждением головного мозга.

1.2.2.1. Внешние факторы, вызывающие БП

Развитие БП может быть вызвано рядом факторов внешней среды, такими как травмы мозга, отравление токсинами, последствия приема определенных лекарств, последствия воспалительных процессов в мозге.

Одним из таких факторов являются травматические повреждения головного мозга, которые значительно увеличивают риск развития заболевания (Gardner R.C. et al., 2015; Lee P.C. et al., 2012). Вероятно, наибольшему риску развития паркинсонизма в результате механических повреждений мозга подвержены профессиональные боксеры. Развитие БП приводит к их уходу из профессионального спорта. Известным примером является случай выдающегося американского боксёра Мохамеда Али, у которого в неполные 40 лет диагностировали БП. Многократный чемпион был вынужден завершить свою спортивную карьеру.

Другим фактором риска развития БП является отравление инсектицидами, такими как 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) и паракват (Lee P.C., et al., 2012). Паракват ингибирует работу комплекса I дыхательной цепи митохондрий, вызывая тем самым увеличение продукции активных форм кислорода и, как следствие, гибель дофаминергических нейронов (Yang W. et al., 2007). Хотя эти вещества уже не используются в качестве инсектицидов из-за их опасности для здоровья человека, в лабораторной практике они по-прежнему широко применяются. Так способность МРТР селективно убивать дофаминергические нейроны при введении в мозг лабораторного животного позволяет создавать *in vivo* модели болезни Паркинсона (Noelker C., et al., 2015).

Длительное влияние на организм марганца в результате работы на производстве, где используется данный металл, загрязнения окружающей среды или прием некачественных, плохо очищенных наркотиков уменьшает возраст развития идиопатической БП в среднем на 10 лет (Ratner M.H. et al., 2014). В исследовании принимали участие только пациенты, у которых был исключен наследственный компонент риска развития БП, т.е. в их семье никому не ставился такой диагноз.

Несмотря на то, что большинство случаев БП являются спорадическими, с точки зрения применения ИПСК для изучения патогенеза данного заболевания наиболее интересными представляются наследственные факторы, вызывающие развитие болезни.

1.2.2.2. Наследственные факторы, вызывающие развитие БП

Среди пациентов с БП у 5-10% заболевание вызвано наследственными факторами (Jain S. et al., 2005). Достаточно подробно изучены пять генов, связанных с развитием БП. Мутации в двух из этих генов (*SNCA*, *LRRK2*) наследуются по аутосомно-доминантному механизму и вызывают классическую БП с поздним дебютом и образованием телец Леви. Другие гены (*PRKN*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2*) наследуются по аутосомно-рецессивному механизму и, как правило, вызывают БП с ранним дебютом; образование α -синуклеин-положительных телец Леви происходит не во всех случаях; болезнь медленно развивается и клинически более управляема. В феврале 2016 года была опубликована работа, в которой была доказана связь мутации в гене *PODXL* (podocalyxin-like gene) с развитием БП с ранним дебютом. Мутации в этом гене наследуются по аутосомно-рецессивному механизму. На модели с использованием

клеток линии PC12 были показаны изменения в ветвлении нейритов клеток, экспрессирующих мутантный ген (Sudhaman S. et al., 2016).

1.2.2.2.1. SNCA (*PARK1/4*)

Мутация, приводящая к аутосомно-доминантной БП, была впервые выявлена в гене, кодирующем α -синуклеин (*PARK1/4*, *SNCA*) (Polymeropoulos M.H. et al., 1997). Позднее у пациентов с ранним дебютом БП в семейном анамнезе была выявлена трипликация этого локуса (Singleton A.B. et al., 2003). Аутосомно - доминантный тип наследования мутаций в гене *SNCA*, эффект дозы гена, наблюдаемый в семьях с дупликацией/трипликацией данного локуса, и данные о том, что α -синуклеин является основным компонентом телец Леви (Spillantini M.G. et al., 1997), свидетельствуют о том, что усиление функции данного белка является токсичным. α -синуклеин – в физиологических условиях несвернутый белок (Natively unfolded), состоящий из 140 аминокислот, обладающий склонностью к нарушению конформации (для обзора см. Surguchov A., 2008). α -синуклеин может образовывать олигомеры и фибриллы *in vitro* (Conway K.A. et al., 2000), которые стабилизируются в присутствии дофамина (Conway K.A. et al., 2001), что может отчасти объяснить чувствительность дофаминергических нейронов среднего мозга к токсичности, вызванной агрегацией α -синуклеина. Значительные усилия были затрачены на выяснение функции этого белка и того, как она меняется при мутации. Показано, что α -синуклеин экспрессируется практически во всем мозге и локализуется в пресинаптических окончаниях (Maroteaux L. et al., 1988). Исследования как *in vitro*, так и *in vivo* (повышенная экспрессия и нокаут) предполагают, что α -синуклеин может играть важную роль в таких процессах, как динамика движения мембран, включая участие в синаптической передаче (Surguchov A., 2008; Martin I. et al., 2011). Неправильное сворачивание белка, которое может быть усилено при окислительном стрессе или воспалении, приводит к образованию токсичных продуктов, которые, как предполагается, приводят к изменению свойств мембраны, нарушению деградации белков в протеасоме и нарушению аутофагии.

1.2.2.2.2. PINK1 (*PARK6*)

Мутации в гене, кодирующем phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1), были впервые идентифицированы Е.М. Valente с соавторами (Valente E.M. et

al., 2004) у пациентов с семейными формами БП, характеризующимися ранним дебютом и медленным развитием заболевания, а также хорошим ответом на терапию леводопой. Белок PINK1 состоит из 581 аминокислоты и локализуется на митохондриях. Экспрессируется PINK1 во всем организме, включая мозг (Gandhi S. et al., 2006). При падении потенциала на мембране митохондрии белок PINK1 фосфорилируется по Ser-402 и становится активным (Aerts L. et al., 2015). Активированная киназа PINK1 рекрутирует белок паркин к внешней мембране поврежденной митохондрии (Рисунок 6). Паркин, являющийся E3-убиквитин лигазой, убиквитинилирует свои субстраты на поверхности митохондрии, что служит сигналом для направления такой митохондрии на митофагию (Narendra D.P., et al., 2010). Таким образом, паркин и PINK1 вовлечены в один каскад реакций, регулирующих функции митохондрий и обеспечивающих их правильную утилизацию. Потеря одного из участников каскада ведет к накоплению поврежденных митохондрий, увеличению продукции активных форм кислорода и, следовательно, к гибели нейронов.

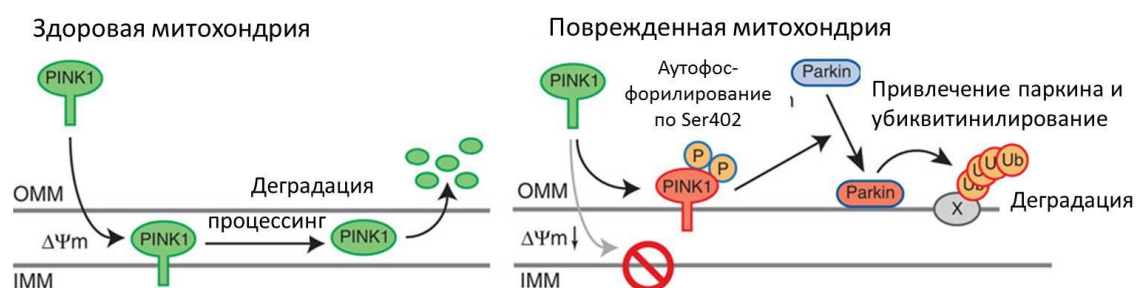


Рисунок 6. Активация киназы PINK1 при падении потенциала митохондрии и привлечение паркина к поврежденной митохондрии. OMM – внешняя мембрана митохондрии, IMM – внутренняя мембрана митохондрии (по Okatsu K. et al., 2012).

1.2.2.2.3. DJ-1 (PARK7)

Мутации в гене *PARK7* были впервые описаны в двух европейских семьях (Bonifati V. et al., 2003), но данных о наличии телец Леви у пациентов с БП, вызванной мутациями в этом гене нет. Белок DJ-1 состоит из 189 аминокислот и экспрессируется повсеместно, наиболее сильная экспрессия наблюдается в астроцитах; редко обнаруживается в тельцах Леви у пациентов, страдающих от идиопатической БП (Bandopadhyay R. et al., 2004; Kumaran R. et al., 2009). Функция DJ-1 не полностью определена, однако известно, что он является сенсором

окислительного стресса и может играть разнообразные роли, от пероксидазы (Andres-Mateos E. et al., 2007) и шаперона (Zhou W. et al., 2006), до РНК-связывающего белка (Blackinton J. et al., 2009) и участвовать в регуляции состояния митохондрий (Larsen N.J. et al., 2011). Хотя истинные механизмы функционирования DJ-1 не выяснены, но есть данные о том, что он действует в параллели с путем PINK1/паркин и влияет на митофагию (Thomas K.J. et al., 2011).

1.2.2.2.4. LRRK2 (*PARK8*)

Мутации в гене, кодирующем Leucine-Rich Repeat Kinase 2, были впервые идентифицированы у ряда семей, страдающих от аутосомно-доминантной формы БП (Paisan-Ruiz C. et al., 2004; Zimprich A. et al., 2004). Дальнейшие исследования показали, что мутации в гене *PARK8* являются наиболее распространенной причиной как наследственных форм БП, так и спорадических (Healy D.G. et al., 2008). *PARK8* кодирует белок из 2527 аминокислот, обладающий как киназной, так и ГТФазной активностью, который экспрессируется в мозге и других органах (Zimprich A. et al., 2004). Известно 6 патогенных точечных мутаций в гене *PARK8* (R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S и I2020T) (Funayama M. et al., 2002). Наиболее распространенной является мутация G2019S, она является причиной 2-7% семейных случаев БП и 1% спорадических случаев (Healy D.G. et al., 2008). Мутантная LRRK2 может вызывать БП из-за усиления своей киназной активности, подавления ГТФазной активности и нарушения способности к димеризации, в зависимости от того, в каком домене произошла мутация (West A.B. et al., 2005; Lewis P.A. et al., 2007; Sen S. et al., 2009). Далеко не все известно о естественных субстратах LRRK2, показано участие данной киназы в процессе роста нейритов, движении синаптических везикул и процессе аутофагии (Greggio E. et al. 2011; Kumar A. and Cookson M.R., 2011). Интересна связь мутаций в LRRK2 с митохондриальным фенотипом БП. Дрозофилы с мутацией в LRRK2 имеют повышенную чувствительность к ингибитору комплекса I ротенону (Keane P.C. et al., 2011). В нейронах, несущих мутацию G2019S в LRRK2, показано пониженное потребление кислорода и увеличение подвижности митохондрий (Cooper O. et al., 2012). LRRK2 взаимодействует с одним из основных белков, участвующих в утилизации поврежденных митохондрий, - паркином через свой ROC (Ras-like G-domain, ГТФазный) домен, однако такое взаимодействие не приводит к усилению убиквитинилирования LRRK2 и играет, вероятно, регуляторную роль (Smith W.W. et al., 2005). В пользу того, что LRRK2 и паркин являются частью одного каскада реакций, связанного с митохондриями, свидетельствует тот факт, что при ингибировании процесса деления

митохондрий в нейронах, полученных от пациента с мутацией G2019S в LRRK2, уменьшается количество поврежденных митохондрий, нормализуется состояние лизосом и исчезает фенотип укороченных нейритов (Su Y.-C. and Qi X., 2013).

1.2.2.2.5. PRKN (*PARK2*)

Мутации в гене *PARK2* были впервые идентифицированы у пяти японских пациентов с аутосомно-рецессивной ювенильной БП (Kitada T. et al., 1998). В связи с тем, что паркин участвует в утилизации поврежденных митохондрий (Martin I. et al., 2011), следует упомянуть о важности этих органелл в жизнедеятельности нейронов. Продукция АТФ в нейронах происходит в основном за счет митохондриального дыхания, роль гликолиза в постмитотических нейронах значительно меньше, чем в глиальных клетках. В ходе митохондриального дыхания производятся активные формы кислорода, и, чем выше интенсивность дыхания, тем их больше. При этом уровень глутатиона в нейронах ниже, чем в астроцитах, что делает их основной мишенью окислительного стресса (Gusdon A.M. et al., 2011). Дофаминергические нейроны больше других подтипов нейронов подвержены окислительному стрессу, т.к. окисление и круговорот дофамина сами по себе ингибируют работу комплекса I и повышают тем самым продукцию активных форм кислорода. Показано нарушение работы комплекса I дыхательной цепи митохондрий в нейронах при болезни Паркинсона в постмортальных образцах. Митохондрии «больных» нейронов производят больше активных форм кислорода, чем не мутантные нейроны. Ингибиторы комплекса I ротенон и МРТР вызывают избирательную гибель дофаминергических нейронов и используются для создания моделей болезни Паркинсона на животных. Это подтверждает особую роль митохондриального дыхания и комплекса I в патогенезе болезни Паркинсона (Keane P.C. et al., 2011).

Кроме отправления на протеолиз белков, паркин также участвует в утилизации нефункциональных митохондрий (Martin I. et al., 2011). Паркин рекрутируется на мембрану митохондрии с помощью киназы PINK1 и метит дефектную митохондрию, направляя её на митофагию, поддерживая гомеостаз митохондрий в клетке (Рисунок 6). В нейронах, имеющих мутацию в паркине, наблюдается изменение морфологии митохондрий при окислительном стрессе, но митохондрии с нормальной морфологией также присутствуют. При обработке СССР поврежденные митохондрии в мутантных нейронах утилизируются неправильно (Imazumi Y. et al., 2012). Паркин может влиять на транспорт митохондрий в клетке, т.к. показано его

связывание с микротрубочками (Yang F. et al., 2005). Паркин контролирует утилизацию дофамина в дофаминергических нейронах среднего мозга, путем увеличения точности дофаминергической передачи и супрессии окисления дофамина (Jiang H. et al., 2012).

Из-за неполной изученности механизмов функционирования, как в норме, так и при патологии, паркин и LRRK2 являются привлекательными моделями для исследования БП. Кроме того, относительно широкая распространенность мутаций в этих генах в популяции упрощает исследователю поиск соответствующего биологического материала.

1.2.3. Модели БП на основе ИПСК

Развитие большинства патологий происходит незаметно, а проявление заболевания происходит зачастую на его терминальной стадии. Более того, многие ткани, подверженные патологии, остаются недоступными для исследований на протяжении всего процесса развития болезни. Особенно это актуально в отношении нейродегенеративных заболеваний, когда патологические ткани возможно изучать только *post mortem*. Более детальное изучение закономерностей нейродегенерации требует разработки адекватных клеточных моделей с аналогичными генетическими мутациями. Исследование культур нейронов, получаемых на основе технологии ИПСК из фибробластов больных с точно охарактеризованными мутациями, а также от больных спорадическими формами болезни, позволит оценить взаимосвязь между дегенеративными изменениями в нейронах и характером клинического синдрома.

Началом применения технологий получения и дифференцировки ИПСК для моделирования заболеваний человека можно считать работу Парка и соавторов (Park I.H. et al., 2010), в которой было впервые сообщено об успешном получении ИПСК от пациентов с различными наследственными заболеваниями. Авторы получили ИПСК от пациентов, страдающих БП, мышечной дистрофией Дюшена, диабетом первого типа, синдромом Дауна и болезнью Гентингтона. Авторы приходят к выводу о том, что такие клетки являются уникальной моделью не только для исследования молекулярно-генетических основ этих заболеваний, но и удобной тест-системой для скрининга потенциальных лекарственных соединений.

В другой работе было продемонстрировано, что ИПСК, способные к дифференцировке в нейроны и глию *in vitro*, также способны восстанавливать поведенческую активность крыс, у которых были индуцированы симптомы БП (Wernig M. et al., 2008).

ИПСК, полученные от пациентов со спорадической формой БП, были способны дифференцироваться в дофаминергические нейроны. При пересадке таких клеток крысам с искусственным паркинсонизмом наблюдалось уменьшение ротационного поведения, вызванного амфетамином. При иммуногистохимическом анализе мозга подопытных животных было обнаружено, что трансплантированные нейроны дают аксональные проекции в другие отделы мозга, причем образования телец Леви в трансплантате не наблюдалось (Hargus G. et al., 2010). В данной работе производные ИПСК от пациентов со спорадической формой болезни оказались не способны проявлять патологический фенотип в культуре. Однако, при более детальном изучении дофаминергических нейронов, полученных из материала пациентов с ненаследственной БП, удалось обнаружить проявления болезни *in vitro*. При сравнении полногеномных профилей метилирования ДНК дофаминергических нейронов, полученных из материала здоровых доноров и пациентов с наследственными и ненаследственными формами БП, были обнаружены различия в паттерне метилирования ДНК между здоровыми клетками и клетками пациентов с БП. Особенно интересно, что нарушения метилирования ДНК были одинаковыми в клетках, полученных от пациентов с наследственной и ненаследственной БП (Fernández-Santiago R. et al., 2015).

Soldner F. с соавторами получили ИПСК от 5 пациентов, страдающих болезнью Паркинсона (Soldner F. et al., 2010). Особый интерес вызывает то, что клетки не содержали вирусных векторов в своем составе, т.к. трансгены были удалены из генома с помощью Cre-рекомбиназы. Полученные клетки демонстрировали сходный с ЭСК человека спектр экспрессии и обладали способностью к эффективной дифференцировке в дофаминергические нейроны.

При работе с ИПСК, полученными из материала пациентов с наследственными формами БП, в большинстве случаев удастся описать характерный фенотип, связанный с патогенезом заболевания. Судя по всему, только такие ИПСК могут служить моделью для изучения заболевания и скрининга лекарственных средств. Liu G.-H. и соавторы 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 «БП» и тоже обнаружили наличие аномалий клеточных ядер (Liu G.-H. et al., 2012).

Одной из мутаций, связанных с болезнью Паркинсона, является мутация в гене митохондриальной киназы PINK1. Данная киназа локализуется на внешней мембране митохондрий и участвует в защите клетки от окислительного стресса. PINK1 опосредует

транслокацию E3-убиквитин лигазы паркина в переставшие функционировать митохондрии. Этот процесс необходим для ликвидации «отработанных» митохондрий из дофаминергических нейронов человека. Мутация в PINK1 не влияет на репрограммирование клеток пациента и на дифференцировку полученных ИПСК в дофаминергические нейроны. В зрелых нейронах, несущих мутацию, при стрессе привлечение паркина к неработающим митохондриям нарушено, что приводит к накоплению в клетке нефункциональных митохондрий и усилению образования новых. В нейронах, полученных из ИПСК дикого типа, подобных нарушений не наблюдалось. В мутантных нейронах патологические процессы элиминировались при повышенной экспрессии в них PINK1 дикого типа (Seibler P. et al., 2011).

Adriane Sanchez-Danez с сотрудниками (Sanchez-Danez A. et al., 2012) провели большое исследование по изучению патогенеза БП на модели ИПСК, полученных от 7 пациентов со спорадической формой, 4 пациентов с мутацией G2019S в гене киназы LRRK2 и 4 пациентов, не имеющих в анамнезе нейродегенеративных заболеваний. Эффективность образования клонов ИПСК варьировала между донорами, но не была связана с наличием БП, а также с возрастом доноров. Авторами был использован 30-дневный протокол для получения дофаминергических нейронов. В результате были получены взрослые дофаминергические нейроны с преимущественным A9 подтипом. Именно эта группа нейронов формирует компактную часть черной субстанции, которая, в свою очередь, подвергается значительной дегенерации при БП.

Еще одним белком, нарушения в функционировании которого связывают с развитием БП, является α -синуклеин (SNCA). Точная функция белка до сих пор не известна. Имеются данные о том, что возможно, он является молекулярным шапероном и регулирует белок-белковые и белок-липидные взаимодействия, а также может играть важную роль в обмене синаптических везикул, в хранении и компартментализации нейротрансмиттеров, в первую очередь дофамина (Byers B. et al, 2011). Хорошо известно, что протофибриллы α -синуклеина являются основным компонентом телец Леви при БП. Это указывает на важную роль процессов агрегации альфа-синуклеина в патогенезе заболевания. Были проведены исследования по выявлению SNCA в дифференцированных дофаминергических нейронах, полученных из ИПСК пациентов с различными формами БП, а также здоровых доноров и было показано, что дофаминергические нейроны от пациентов с мутацией G2019S в гене LRRK2 демонстрируют аномальное накопление SNCA по сравнению с ДА-нейронами от здоровых доноров и больных со спорадической формой БП (Sanchez-Danez A. et al, 2012). Таким образом, эти результаты не только способствуют подтверждению гипотезы о взаимном влиянии мутации LRRK2 и SNCA, но и дают возможность использовать полученные ИПСК в качестве модели моногенной формы

БП. Известно, что БП развивается в течение нескольких, а иногда и десятков лет. Было проведено длительное (65-75 дней) культивирование полученных из ИПСК дофаминергических нейронов, от всех групп пациентов (больные со спорадической формой БП, с мутацией в гене LRRK2 и здоровые доноры) (Sanchez-Danez A. et al, 2012). Пациент-специфичные дофаминергические нейроны культивировали на монослое из постнатальных мышечных астроцитов. Было показано, что дофаминергические нейроны от здоровых доноров были морфологически гомогенны с фенотипом зрелых дофаминергических нейронов с хорошо разветвленными отростками. В то же время дофаминергические нейроны пациентов с БП имели различные изменения в морфологии (уменьшение длины и количества отростков, полное отсутствие отростков, фрагментированные ядра и вакуолизация). Надо отметить, что такие отличия не были видны при стандартном, 30-дневном, культивировании. Через 75 дней культивирования дофаминергические нейроны, полученные от больных с мутантным геном LRRK2 и со спорадической формой БП, несли больший процент апоптотических клеток по сравнению с нормальными клетками.

ИПСК от пациентов с БП были использованы для подтверждения терапевтического действия ранее обнаруженных субстанций, так было подтверждено восстановление патологического фенотипа до нормы с помощью химической молекулы, которая была первоначально найдена в скрининге на дрожжах как потенциальное лекарство против болезни Паркинсона (Chung C.Y. et al., 2013).

Рядом исследователей проводятся эксперименты по пересадке дофаминергических нейронов, полученных из ИПСК на животных моделях. Так, вполне успешно осуществили пересадку дифференцированных клеток крысам с моделью БП. После имплантации донорскими клетками были отмечены существенные улучшения моторных функций. (Hargus G. et al., 2010; Cai J. et al., 2010; Martinez-Morales P.L. et al., 2012; Doi D. et al., 2014; Nishimura K. et al., 2015).

2. Материалы и методы

2.1 Реагенты и материалы исследования

2.1.1. Базовые среды и добавки к ним

DMEM (ПанЭко, Россия)

DMEM/F12 (ПанЭко, Россия)

mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Канада)

FBS (HyClone, США)

Заменитель сыворотки (Invitrogen, США)

Глутамин 100мМ раствор (Biological Industries, Израиль)

Смесь аминокислот (Hyclone, США)

Пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия)

N2 добавка (GIBCO, США)

B27 добавка (GIBCO, США)

2.1.2. Рекombинантные белки и низкомолекулярные соединения

bFGF (PeproTech, США)

Noggin (PeproTech, США)

Shh (PeproTech, США)

FGF8 (PeproTech, США)

BDNF (PeproTech, США)

GDNF (PeproTech, США)

пурморфамин (Stemgent, США)

форсколин (Stemgent, США)

SB431542 (Stemgent, США)

Дорсоморфин (Stemgent, США)

Вальпроевая кислота (VPA) (Sigma-Aldrich, США)

BIX-01294 (Sigma-Aldrich, США)

ROCK ингибитор (Y27632) (Stemgent, США)

2.1.3. Другие реактивы для работы с культурами клеток

Аккутаза (GIBCO, США)

Раствор Версена (ПанЭко, Россия)

Колцемид (Sigma-Aldrich, США)

Matrigel (BD Biosciences, США)

0.05% и 0,25% растворы трипсина (HyClone, США)

Диспаза (Invitrogen, США)

Диметилсульфоксид (ДМСО) (ПанЭко, Россия)

β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США)

Желатин (Sigma-Aldrich, США)

Трансфекционный агент Metafectene (Biontex)

2.1.4. Реактивы для молекулярной биологии

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (ПанЭко, Россия)

Параформальдегид (Sigma-Aldrich, США)

Tween20 (Sigma-Aldrich, США)

Сыворотка козы (HyClone, США)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США)

DAPI (4',6-диамино-2-фенилииндол дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США)

RNeasy mini kit (Qiagen, США)

RNase DNase free set (Qiagen, США)

Случайные шестинуклеотидные праймеры (Синтол, Россия)

MMLV обратная транскриптаза (Promega, США)

Ингибитор рибонуклеаз (Promega, США)

Дезоксирибонуклеотиды (Fermentas, США)

Taq полимераз (Fermentas, США)

Раствор Гимза (ПанЭко, Россия)

2.1.5. Расходные материалы

Чашки Петри диаметром 35мм, 60мм и 100мм, многолуночные плашки (Corning, США)

Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США)

Центрифужные пробирки, одноразовые пипетки, криопробирки (Costar, США)

2.1.6. Составы сред для культивирования клеток

Среда для хранения и культивирования биоптата кожи: среда DMEM, 15% FBS, 1мМ глутамин, 100 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Среда для культивирования фибробластов: DMEM, 15% FBS, 1мМ глутамин, 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин.

Среда для культивирования клеток линии Phoenix: DMEM, 5% FBS (инактивированная нагреванием 1 час при 56C), 50 ед./мл пенициллин - стрептомицин, 1мМ глутамин.

Среда для культивирования плюрипотентных стволовых клеток человека на фидере: DMEM/F12, 20% заменителя сыворотки, 2 мМ глутамин, 0.1 мМ β-меркаптоэтанол, 1% смесь аминокислот, bFGF 10 нг/мл, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл).

Среда для культивирования эмбрионидных телец: DMEM/F12, 20% FBS, 2 мМ глутамин, 0.1 мМ β-меркаптоэтанол, 1% смесь аминокислот, пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл).

Среда для нейрональной дифференцировки ИПСК: DMEM/F12, 2% заменителя сыворотки, 1% N2 добавка, 1мМ глутамин, 1% смесь аминокислот, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 80 нг/мл Noggin, 10 мкМ SB431542, 2 мкМ дорсоморфин.

Среда для культивирования нейрональных предшественников: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1мМ глутамин, 1% смесь аминокислот, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 100 нг/мл Shh, 100 нг/мл FGF8 и 10 мкМ пурморфамина.

Среда для созревания нейронов: DMEM/F12, 2% B27 добавка, 1мМ глутамин, 1% смесь аминокислот, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин, 20нг/мл BDNF, 20нг/мл GDNF, 200мкМ аскорбиновая кислота и 4мкМ форсколина.

2.2. Протоколы экспериментов

2.2.1. Информация о донорах биологического материала

Взятие биопсии кожи у пациентов проводили в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии» РАМН после подписания пациентами информированного согласия. Диагноз «БП», генетический анализ и наблюдение за клинической картиной болезни проводили в том же центре. В настоящее исследование были включены 3 пациента мужского пола с генетически обусловленными формами БП (возраст пациентов на момент взятия биопсии 60-65 лет). Двое пациентов страдали аутосомно-доминантной формой БП и были гетерозиготными носителями мутации G2019S в гене *PARK8* (хромосома 12q12, форма *PARK8*), кодирующем киназу LRRK2. Один пациент страдал аутосомно-рецессивной формой болезни и был компаунд-гетерозиготным носителем двух мутаций (IVS1+1G/A и делеция 202-203 (AG) нуклеотидов во 2-м экзоне) в гене *PARK2* (паркин, хромосома 6q25.2-27, форма *PARK2*). Формы *PARK2* и *PARK8* являются наиболее изученными из всех генетических вариантов первичного паркинсонизма (Mizuno Y. et al., 2008). В качестве контрольных образцов использованы фибробласты кожи, полученные от трех здоровых доноров: мужского пола возраста 60 лет, женского пола возраста 18 лет и женского пола возраста 26 лет.

2.2.2. Получение первичных культур фибробластов кожи пациентов

После взятия биопсии эксплант можно хранить в среде для биоптата кожи в течение нескольких часов. Эксплант в капле среды для фибробластов помещали на крышку чашки Петри диаметром 6 см и тонким, острым скальпелем разрезали на небольшие кусочки (около 0,5 мм). Края кусочков должны быть ровными, без выступающих нитей коллагена, т.к.

неровный край препятствует выходу клеток из экспланта. Полученные кусочки помещали каждый в отдельную чашку Петри диаметром 35 мм или по 3-4 в чашку Петри диаметром 6 см и прижимали сверху стерильным покровным стеклом. На стекло наливали среду для культивирования фибробластов, стараясь не сдвинуть стекло. На чашку Петри диаметром 35 мм необходимо 3-4 мл среды, на чашку Петри диаметром 6 см — 7-8 мл среды. Экспланты инкубировали в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 80% влажности и 37°C. Через неделю клетки (сначала кератиноциты, потом фибробласты) начинали активно выходить из экспланта, в это время меняли среду на свежую, стараясь не сдвинуть покровное стекло. Далее меняли среду по необходимости в зависимости от количества растущих клеток. Примерно через 3 недели (по достижении монослоя) рассевали полученные клетки из расчета 1:2. Перед пересевом клетки промывали PBS. Затем клетки инкубировали 5 мин. в 0,25% растворе трипсина, инактивировали трипсин средой для фибробластов. Суспензию фибробластов центрифугировали 5 мин. при 200 g (Eppendorf Centrifuge 5702), клетки ресуспендировали в среде для культивирования фибробластов и рассевали на чашки Петри. При дальнейшем культивировании среду меняли один раз в два дня.

2.2.3. Получение лентивирусов

День0:

Клетки линии Phoenix (коммерчески доступная линия упаковочных клеток для сборки лентивирусных частиц, полученная на основе линии HEK293) рассевали на чашки Петри диаметром 10 см, покрытые желатином (примерно по 2 млн клеток на чашку). Для культивирования использовалась среда для культивирования клеток линии Phoenix.

День1:

Клетки Phoenix трансфицировали вспомогательными плазмидами, содержащими вирусные гены Rev (19% по массе от общего количества ДНК), RRE (37% по массе от общего количества ДНК), VSV-G (7% по массе от общего количества ДНК) и целевой плазмидой, несущей ген Oct4 (LeGo-hOct4) (или Sox2 (LeGo-hSox2), или Klf4 (LeGo-hKlf4), или c-Myc (LeGo-hc-Myc)) (37% по массе от общего количества ДНК), с помощью трансфекционного агента Metafectene в пропорции 40 мкл Metafectene на 16 мкг ДНК на чашку Петри диаметром 10см. Процедура трансфекции выполнялась по протоколу производителя трансфекционного агента Metafectene – Biontex (http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/upload/pdf/Manual_METAFECTENE_en.pdf).

Дни3-5:

Начиная с третьего дня, каждые 24 часа собирали вирусный супернатант, фильтровали его через 0.45мкм фильтр и хранили при температуре +4°C. На пятый день собранный вирусный супернатант объединяли и замораживали в аликвотах по 1 мл при температуре -70°C.

Инфекция клеток лентивирусами для определения титра вируса

За час до инфекции в среду для культивирования к клеткам Phoenix, находящимся в состоянии 20%-80% монослоя, добавляли полибрен до концентрации 8 мкг/мл. Затем клетки инфицировали вирусным супернатантом в различных разведениях (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625).

Определение титра вируса

Через 48 часов после инфекции рассчитывали титр вируса или MOI (multiplicity of infection). Титр для вируса, несущего ген GFP, подсчитывали, определяя процент флуоресцирующих клеток. На микрофотографиях подсчитывали общее число клеток и число клеток, экспрессирующих трансген. По результатам подсчета строили графики зависимости доли трансфицированных клеток от количества вирусного супернатанта. Для тех разведений, доля трансфицированных клеток в которых была ниже 10%, т.е. для точек, находящихся в линейной области зависимости, мы предполагали, что в каждую клетку попала одна вирусная частица. В таком случае, число инфицированных клеток равно числу добавленных вирусных частиц в известном объеме. Для вирусов, несущих гены Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус предварительно проводили иммуноцитохимическую окраску трансфицированных клеток антителами к соответствующим транскрипционным факторам.

2.2.4. Получение ИПСК с помощью лентивирусных векторов

Фибробласты кожи человека высевали по 40000 клеток в среде для фибробластов с 2 нг/мл bFGF на 35 мм культуральную чашку. Через 2 дня после посева клетки инфицировали лентивирусными частицами, LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2, LeGO-hc-Мус, LeGO-hKLF4, MOI 10, 10, 5, 5 соответственно. Через 5 дней после инфекции клетки пересевали 1 к 12 по площади

на 35 мм культуральные чашки на фидерный слой из эмбриональных фибробластов мыши в среде для культивирования фибробластов. На следующий после пересева день среду меняли на среду для плюрипотентных клеток человека. На 6 день после инфекции в среду к клеткам добавляли вальпроевую кислоту (VPA) до концентрации в среде 1 мМ и VIX-01294 до концентрации в среде 2 мкМ. Затем клетки культивировали в среде с этими «малыми молекулами» в течение 10–12 дней, среду меняли раз в 1-2 дня. К этому моменту на чашках образовалось множество колоний клеток с различной морфологией. Колонии, морфологически сходные с ЭСК человека, механически отбирали и культивировали отдельно в условиях культивирования ЭСК и ИПСК человека.

2.2.5. Получение ИПСК человека с помощью генетических конструкций на основе вируса Сендай

Вирус Сендай, несущий в своем геноме транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, были любезно предоставлены доктором Яри Коистинахо из Института Восточной Финляндии (г. Куопио). (ДХ) – дни от момента посева клеток для репрограммирования.

1. (Д0) За день до трансфекции высевали 300000 фибробластов кожи человека на лунку 6-луночной плашки в 2мл среды для культивирования фибробластов и подращивали клетки в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 80% влажности и 37°C.
2. (Д1) Трансдуцировали клетки вирусами, несущими гены «коктейля Яманака» (hOCT4, hSOX2, hc-Myc, hKLF4). Каждый вирус в количестве 5 вирусных частиц на клетку (MOI 5). Клетки инкубировали с вирусными частицами 24 часа в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 80% влажности и 37°C.
3. (Д2) Меняли среду инфицированным клеткам на свежую среду для культивирования фибробластов.
4. (Д3) Меняли среду инфицированным клеткам на свежую среду для культивирования фибробластов.
5. (Д5) Меняли среду инфицированным клеткам на свежую среду для культивирования фибробластов.

6. (Д6) Пересевали инфицированные клетки с помощью 0,25% трипсина на фидерный слой из фибробластов крайней плоти человека (любезно предоставлены Институтом Восточной Финляндии г. Куопио) из расчета 50000 клеток на чашку Петри диаметром 10см. Клетки фидерного слоя перед посевом на них инфицированных фибробластов находились в состоянии 100% видимой плотности и были обработаны митомицином С для предотвращения их размножения. С этого момента клетки культивировали в среде для культивирования плюрипотентных клеток человека с добавлением 0,5мМ бутирата натрия.
7. Смену среды осуществляли каждый день.

На 15 день после инфекции начинали отбор клонов, основываясь на морфологическом критерии схожести колоний с колониями ЭСК человека. Отобранные клоны культивировали как самостоятельные линии в среде для культивирования плюрипотентных клеток человека без бутирата натрия на фидерном слое из фибробластов крайней плоти человека. По прошествии 2-4 пассажей ИПСК переводили в бесфидерные условия культивирования в среде mTeSR1 на подложке из матригеля.

2.2.6. Культивирование ЭСК и ИПСК человека

Культивирование проводили в среде mTeSR1 в соответствии с инструкциями производителя (<http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/B/C/A/2/B/29106MAN.pdf?la=en>). В качестве подложки для культивирования использовали Matrigel. Приготовление покрытых матригелем культуральных чашек и планшетов производили в соответствии с инструкциями производителя. Matrigel разводили в 10 раз средой DMEM и расфасовывали по 1мл или 0,5 мл в пробирки типа эппендорф и хранили при -70°C. По мере необходимости аликвоты размораживали и разводили еще в 10 раз, таким раствором покрывали культуральный пластик в течение часа при комнатной температуре. Клетки пассировали с использованием 1 мг/мл диспазы или 0,05% трипсина. При пересеве трипсином в среду для культивирования добавляли ROCK ингибитор (Y27632) в концентрации 5 мкМ. Для криоконсервации снятые с подложки с помощью трипсина или диспазы и промытые средой DMEM, содержащей 10% FBS, клетки ресуспендировали в FBS и переносили в криопробирку, затем к суспензии по каплям добавляли

равный объем смеси FBS-20% DMSO и замораживали при -70°C , в 1мл замораживали по 2 млн. клеток. На следующий день замороженные клетки переносили в жидкий азот для длительного хранения.

2.2.7. Определение мутаций в линиях ИПСК

Для определения наличия мутации в ИПСК, полученных от пациентов с БП, использовали клетки на 10 пассаже. ИПСК снимали с подложки с помощью 0,05% раствора трипсина. Трипсин инактивировали добавлением двух объемов среды DMEM с 10% FBS, клетки центрифугировали при 300 g 5 мин. Клеточный осадок промывали PBS и центрифугировали в тех же условиях. ДНК из клеток выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис Т. с соавт., 1984).

Методом ПЦР амплифицировали последовательности генома, содержащие мутации с помощью праймеров, указанных в таблице 2. Затем секвенировали продукт ПЦР с праймеров, расположенных внутри полученного ПЦР-продукта (Таблица 2, праймеры приведены в квадратных скобках). Секвенирование проводила компания Евrogen (Россия).

Таблица 2.

Название гена	Последовательности праймеров	Температура отжига
<i>PARK8</i>	5'GTGGACATTTATATTTAAGG 3' 5'GATGCTTGCATTTTTTCAC 3' [5'GTGGACATTTATATTTAAGG 3' 5' GATGCTTGCATTTTTTCAC 3']	60°C, 35 циклов
<i>PARK2</i> (делеционная мутация)	5'TTAGGGCTTCGAGTGATGCT3' 5'CACTAAGCCTAGCTCGTGTGT3' [5' TGCTCACTTTCTCTTCTCCCTT 3' 5'CACCTGCACAGTCCAGTCAT 3']	60°C, 35 циклов
<i>PARK2</i> (мутация IVS1+1G/A)	5' ATTCCTAGGGCCGGGCG 3' 5'GCTTCGAACGCACACACTGG3' [5' ATTTAACCCAGGAGAGCCGC 3']	60°C, 35 циклов

	5'TGGCCCCGTCATTGACAGTT 3']	
--	----------------------------	--

2.2.8. Измерение пролиферативной активности ИПСК человека

Измерение пролиферативной активности ИПСК проводили методом прямого подсчета количества клеток через 48, 72 и 96 часов после посева. В лунку 24-луночной плашки высевали по 50000 клеток в среде mTeSR1. Посев и культивирование проводили по обычному протоколу. Обсчет полученных данных проводили с помощью программы Excel Microsoft. Данные приведены в виде пролиферативного индекса, который является отношением числа клеток в конкретный момент подсчета к исходному числу клеток.

2.2.9. Иммуноцитохимический анализ

Подготовленные для окраски клетки на чашке Петри промывали 2 раза PBS, фиксировали 4% параформальдегидом в PBS (pH 6,8) 20 мин при комнатной температуре, промывали PBS с 0.1% Tween 20 3 раза. Пермиабилизовали мембраны клеток раствором PBS с 0,1% Triton-X100 10 минут при комнатной температуре. Блокировали неспецифическую сорбцию антител инкубацией в течение 30 мин в PBS с 0.1% Tween 20, содержащем 5% FBS, 2% сыворотки козы при комнатной температуре. В работе использовали антитела против следующих маркеров: Oct4 (Cell Signaling), Nanog (Cell Signaling), SSEA4 (Cell Signaling), Tra-1-81 (Cell Signaling), CD105 (DAKO), тропомиозин (Abcam), панцитокератин (Thermo Scientific), β -III-тубулин (Abcam), α -фетопротейн (DAKO), тирозингидроксилаза (Abcam), Sox1 (Abcam), NeuN (Millipore), десмин (Abcam). Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS с 0.1% Tween 20, содержащем 5% FBS и 2% сыворотки козы, инкубировали 1 ч при комнатной температуре (поверхностные антигены) или ночь при +4°C (цитоплазматические и ядерные антигены), затем отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0.1% Tween 20. Вторичные антитела (Invitrogen, США), конъюгированные с флуоресцентными метками (Alexa 488, Alexa 555, Alexa 546, Alexa 647) наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0.1% Tween 20. Затем препараты инкубировали с DAPI (4',6-диамино-2-фенилииндол дигидрохлорид) 0.1 мкг/мл в PBS 10 мин

для визуализации ядра клетки, отмывали 2 раза PBS. Полученные препараты исследовали под микроскопом.

2.2.10. Полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией

Тотальную РНК из клеточных культур выделяли с помощью RNeasy mini kit согласно инструкциям производителя (<https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>). Обработку ДНКазой осуществляли непосредственно на колонках, с использованием RNase DNase free set. Концентрацию РНК определяли с помощью прибора Qubit (Invitrogen) согласно инструкциям производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных шестинуклеотидных праймеров, обратной транскриптазы MMLV, ингибитора рибонуклеаз, дезоксирибонуклеотидов согласно инструкциям производителя обратной транскриптазы (<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/m-mlv%20reverse%20transcriptase%20protocol.pdf>). На одну реакцию использовали 1-2 мкг тотальной РНК. Для проведения ПЦР-амплификации продуктов реакции обратной транскрипции использовали 0.05-0.1 часть реакционной смеси. ПЦР-амплификацию проводили с помощью Taq полимеразы согласно инструкциям производителя (Fermentas) в амплификаторе фирмы Eppendorf. Список использованных в работе праймеров и условия амплификации приведены в таблице 3. ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1-2% агарозном геле.

Таблица 3.

Праймеры, использованные в исследовании.

Название гена	Последовательности праймеров	Температура отжига
OCT4 (<i>POU5F1</i> , POU Class 5 Homeobox 1)	5'CGACCATCTGCCGCTTTGAG3' 5'CCCCCTGTCCCCCATTCCTA3'	69°C, 30 циклов
SOX2 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2)	5'TCCTGATTCCAGTTTGCCTC3' 5'GCTTAGCCTCGTCGATGAAC3'	69°C, 30 циклов
NANOG (Homeobox Transcription Factor Nanog)	5'CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC3' 5'TGGAAGGTTCCCAGTCGGGTTCACC3'	69°C, 30 циклов

DPPA4 (Developmental Pluripotency Associated 4)	5'CAAGCCCAAGAACAGCCTAGTGAA3' 5'TGACGAAGCAGTCGTTGAGTGAGA3'	63°C, 30 циклов
HESX1 (HESX homeobox 1)	5'ACCTGCAGCTCATCAGGGAAAGAT3' 5'AAAGCAGTTCTTGGTCTCGGCCT3'	66°C, 30 циклов
TH (тирозингидроксилаза)	5' CCAAGCAGGCAGAGGCCATCATGT3' 5' GGCGTAGAGGCCCTTCAGCGT3'	60°C, 30 циклов
SYP (Синаптофизин)	5' GCTTTGTGAAGGTGCTGCAA3' 5'GCCTGAAGGGGTACTCGAAC3'	60°C, 30 циклов
GAPDH (Глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа)	5'GAAGGTGAAGGTGCGAGTCA3' 5'TTCACACCCATGACGAACAT3'	60°C, 25 циклов
exoOCT4	5'CGACCATCTGCCGCTTTGAG3' 5'CGAAGTTATTAGGTCCCTCG3'	66°C, 30 циклов
exoSOX2	5'TCCTGATTCCAGTTTGCCTC3' 5'CGAAGTTATTAGGTCCCTCG3'	66°C, 30 циклов
exoKLF4	5'GCGCTGCTCCCATCTTTCT3' 5'CGAAGTTATTAGGTCCCTCG3'	66°C, 30 циклов
exoC-MYC	5'AGTAATTCCAGCGAGAGGCA3' 5'CGAAGTTATTAGGTCCCTCG3'	55°C, 30 циклов

2.2.11. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека

За 8-12 ч до фиксации ИПСК, культивируемым в бесфидерных условиях, меняли среду. За 20 мин до фиксации в среду клеткам добавляли колцемид до концентрации 0.1-0.2 мкг/мл. После инкубации с колцемидом отбирали среду, промывали 2 раза PBS, после чего добавляли 0.05% раствор трипсина и инкубировали при комнатной температуре 1-1.5 мин. Отбирали раствор трипсина, суспендировали клетки в 1мл среды DMEM с 10% FBS и переносили в 15 мл пробирку. Добавляли 5 объемов 0.075 М раствора KCl комнатной температуры и инкубировали 20 минут при 42 С. Добавляли фиксатор (метанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 6:1) в соотношении с объемом клеточной суспензии 1:40 и перемешивали переворачиванием. Клеточную суспензию центрифугировали при 4°C 200-400 g в течение 4 мин, 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 мин. 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 мин. 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 при 40-60 °C.

2.2.12. GTG-Дифференциальное окрашивание

Высушенные на воздухе препараты метафазных хромосом выдерживали несколько дней при комнатной температуре. Препараты обрабатывали 0.05% трипсином в течение 1-5 мин при комнатной температуре, промывали PBS. Затем препараты инкубировали в красящем растворе Гимза 5% в течение 1-5 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Затем метафазные пластинки анализировали и фотографировали под микроскопом при увеличении 630X.

2.2.13. Формирование и культивирование эмбрионных телец

Колонии ИПСК снимали с чашек Петри раствором диспазы с концентрацией 1 мг/мл, диссоциировали на фрагменты 400-600 клеток, в среде mTeSR1 переносили в лунку 24-луночной плашки с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates. На следующий день меняли половину среды на среду для культивирования эмбрионных телец. Далее mTeSR1 постепенно заменяли на среду для культивирования эмбрионных телец. Среду меняли раз в 2 дня, добавляя по 2 мл среды на лунку 24-луночной плашки.

2.2.14. Спонтанная дифференцировка ИПСК человека

Эмбрионные тельца через 10-20 дней культивирования переносили в предварительно покрытые 0,1% желатином чашки Петри и культивировали в среде для эмбрионных телец. Эмбрионные тельца прикреплялись к желатиновой подложке, после чего начиналась миграция клеток из них на поверхность чашки. Через 2-3 недели образовывались обширные

области дифференцированных клеток. Полученные дифференцированные клетки окрашивали антителами на маркеры производных трех зародышевых листков.

2.2.15. Дифференцировка ИПСК в дофаминергические нейроны

1. ИПСК пересевали трипсином и высевали в плотности 40000 клеток/см² в среде mTeSR1 в присутствии 5 мкМ ингибитора ROCK.
2. По достижении плотности около 80-90 % среду mTeSR1 меняли на среду для нейрональной дифференцировки (14 дней, смена среды через день).
3. Образовавшиеся нейрональные предшественники снимали с подложки раствором Версена или аккутазой, инкубируя клетки 10 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C. Центрифугировали 5 мин при 300g. При использовании аккутазы дважды промывали клетки средой DMEM/F12, каждый раз центрифугировали в тех же условиях. Рассевали клетки из расчета 250000- 400000 клеток на см² на чашки Петри или многолуночные планшеты (в зависимости от дальнейшей задачи), покрытые матригелем, и культивировали 10 дней в среде для культивирования нейрональных предшественников (смена среды через день).
4. До полной зрелости клетки ещё две недели культивировали в среде для созревания.

На стадии 2 и 3 данного протокола нейрональные предшественники могут быть пересеяны или заморожены. Рутинный пересев производили раствором Версена или аккутазой, как описано выше. Для криоконсервации снятые с подложки и промытые клетки ресуспендировали в FBS и переносили в криопробирки, затем к суспензии по каплям добавляли равный объем смеси FBS-20% DMSO и замораживали на -70°C. На следующий день криопробирки переносили в жидкий азот.

2.2.16. Проточная цитофлуориметрия

2.2.16.1. Окрашивание поверхностных маркеров

1. Зрелые нейроны снимали с подложки раствором Версена, инкубируя клетки 10 мин в CO₂-инкубаторе. Центрифугировали 5 мин на 300 g. Дважды промывали клетки средой DMEM/F12, каждый раз центрифугировали в тех же условиях.
2. 500000 клеток ресуспендировали в 100 мкл PBS без кальция и магния с добавлением 1% FBS и добавляли первично меченные фикоэритрином антитела против N-CAM (DAKO),

первично меченные FITC антитела против CD24 (DAKO) и соответствующий изотип-контроль (DAKO) в разведениях, рекомендованных производителем.

3. Инкубировали клетки с антителами 1 час при +4°C.
4. Центрифугировали клетки при 400 g 5 мин при +4°C, отбирали супернатант. Промывали клетки PBS без кальция и магния с добавлением 1% FBS один раз и центрифугировали при тех же условиях. Осадок клеток ресуспендировали в среде для созревания нейронов (200000 клеток в 100 мкл среды). Суспензию клеток смешивали с равным объемом раствора DAPI 400 нг/мл и инкубировали 5 минут на льду.
5. Анализировали клетки на проточном цитофлуориметре Acea NovoCyte 3000. На одну точку брали по 500000 клеток.
6. Анализировали полученные данные в программе FlowJo. DAPI-негативные клетки выделяли, как популяцию живых клеток, внутри этой популяции оценивали долю N-CAM – положительных и CD24 - положительных клеток.

2.2.16.2. Окрашивание цитоплазматических маркеров и окрашивание для анализа клеточного цикла

1. Зрелые нейроны снимали с подложки раствором Версена, инкубируя клетки с раствором 10 мин в CO₂-инкубаторе. Центрифугировали 5 мин на 300 g. Дважды промывали клетки PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS.
2. Ресуспендировали клетки в 1% PFA и инкубировали на льду 15 минут. Дважды промывали клетки PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS.
3. К осадку клеток осторожно добавляли 80% этанол и инкубировали на льду 30 мин.
4. Дважды промывали клетки PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS.
5. Каждую пробу ресуспендировали в 200 мкл PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS и разделяли пополам. К одной части добавляли антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam), к другой – изотип-контроль (026102, Invitrogen) и инкубировали при +4°C в течение ночи.
6. Дважды промывали клетки PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS. Добавляли к клеткам вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa488, и инкубировали на льду 30 мин.
7. Дважды промывали клетки PBS без ионов кальция и магния с добавлением 1% FBS. Ресуспендировали в том же буфере по 200000 клеток в 100 мкл. На одну точку брали по 500000 клеток, добавляли равный объем раствора DAPI 400 нг/мл.

8. Анализировали клетки на проточном цитофлуориметре Acea NovoCyte 3000.
9. Остальные клетки центрифугировали и ресуспендировали по 200000 клеток в 100 мкл в растворе 1мг/мл DAPI в PBS и инкубировали 30 минут на льду. Клетки, окрашенные таким образом, использовали для анализа клеточного цикла.
10. Проводили анализ клеточного цикла на проточном цитофлуориметре Acea NovoCyte 3000.
11. Анализировали полученные данные в программе FlowJo.

2.2.17. Измерение выработки дофамина нейронами

Нейроны культивировали в лунках 24-луночной плашки согласно описанному выше протоколу. На 38 день дифференцировки клетки 3 раза промывали буфером следующего состава 10мМ HEPES, 114мМ NaCl, 5,3мМ KCl, 1мМ MgCl₂, 2мМ CaCl₂, 30мМ глюкозы, 1мМ глицина, 0,5мМ пирувата натрия (Bading H. et al., 1993). По составу солей используемый буфер близок к среде DMEM/F12, в которой культивировали нейроны. Такой буфер используется для кратковременной инкубации нейрональных культур, и в его составе нет веществ, мешающих хроматографическому определению дофамина. Затем клетки инкубировали в 1 мл того же буфера в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут. Супернатант собирали и хранили на -70°C до измерения. Концентрацию дофамина в кондиционированном на клетках буфере определяли с помощью ион-парной обращеннофазовой хроматографии с амперометрической детекцией (Колонка - Nucleosil C18 4X250 мм). В качестве отрицательного контроля использовали буфер, который не инкубировали с клетками.

2.2.18. Полногеномный анализ метилирования ДНК

Для анализа метилирования ДНК был использован Infinium HumanMethylation450 (Illumina) микроэrray. Для выделения ДНК использовали ИПСК и дифференцированные из них нейроны, обогащенные ТН-положительными клетками, на 38 день дифференцировки. Оба типа клеток снимали с подложки с помощью 0,05% раствора трипсина. Трипсин инактивировали добавлением двух объемов среды DMEM с 10% FBS, клетки центрифугировали при 300 g 5 мин. Клеточный осадок промывали PBS и центрифугировали в тех же условиях. ДНК из клеток выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис Т. с соавт., 1984). Бисульфитная конверсия, гибридизация и сканирование на iScan (Illumina) проводились компанией Генотек. Полученные данные были обработаны в компании

Генотек и сотрудником лаборатории генетики развития ИОГен РАН Шутовой М.В. с использованием пакетов программ GenomeStudio и IMA R (<http://cran.r-project.org/>). Beta-value и p-value для каждого образца загружали в программу IMA R (<http://cran.r-project.org/>), данные обрабатывали в этой программе. Для поиска различий в индивидуальных сайтах CpG мы использовали следующие критерии: разница средних значений между группами образцов $>0,2$; уровень значимости детекции p-value < 0.01 ; параметр наличия ложных результатов по тесту Бенджамини-Хочберг q-value < 0.05 .

2.2.19. Полногеномный транскриптомный анализ

Для полногеномного транскриптомного анализа использовали дифференцированные из ИПСК нейроны, обогащенные ТН-положительными клетками, на 35, 50 и 75 дни дифференцировки. Клетки снимали с подложки с помощью 0,05% раствора трипсина. Трипсин инактивировали добавлением двух объемов среды DMEM с 10% FBS, клетки центрифугировали при 300g 5 мин. Клеточный осадок промывали PBS и центрифугировали в тех же условиях. Тотальную РНК из клеточного осадка выделяли с помощью набора реактивов RNeasy mini kit согласно инструкциям производителя. Обработку ДНКазой осуществляли непосредственно на колонках, с использованием RNase DNase free set.

Тотальную РНК конвертировали в кДНК и наносили на HT-12v4 Expression BeadChips (Illumina, Inc.), затем сканировали прибором iScan (Illumina, Inc.) (выполнено в компании Генотек). Качество данных проверяли в программе GenomeStudio. Данные нормализовали по внутренним контролям. Нормализовали данные по протоколу IlluminaCustom в программе GenomeStudio. В анализ брали данные с уровнем значимости дифференциальной экспрессии Diff p-value $<0,05$, при этом уровень значимости детекции должен был соответствовать Detection p-value $< 0,01$ в обеих сравниваемых группах. Достоверными считали различие в экспрессии между сравниваемыми группами больше, чем два раза. Также учитывали, чтобы разброс стандартных отклонений не перекрывал эту разницу по экспрессии. Анализ онтологии генов проводили с помощью программы WebGestalt (Wang J. et al., 2013).

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Получение, характеристика и сравнительный анализ эффективности репрограммирования фибробластов кожи человека интеграционным и неинтеграционным методами

В исследование были включены три пациента мужского пола с наследственной болезнью Паркинсона. Два пациента имели мутации в гене *PARK8*, кодирующем киназу *LRRK2* (замена 6055G>A (G2019S) в 41 экзоне (хромосома 12q12)), возраст обоих пациентов на момент взятия биопсии составлял 60 лет; (линии клеток, полученные из материала от этих пациентов, обозначили FPD1 и FPD2). В исследование был также включен пациент с мутациями в двух аллелях гена *PARK2*, кодирующего E3-убиквитин-лигазу паркин (делеция 202-203 AG во втором экзоне и сплайсинговая мутация в 1 интроне (IVS1+1G/A)), возраст пациента на момент взятия биопсии 65 лет (линии клеток, полученные из материала от этого пациента, обозначили FPD3). Наличие мутаций у пациентов было определено ранее при постановке диагноза в ФГБНУ «Научный центр неврологии» методом секвенирования. Также были получены биоптаты от трех здоровых доноров: один донор мужского пола, возраст на момент взятия биопсии 60 лет (линии клеток, полученные из материала от этого донора, обозначили FRG), двух доноров женского пола, возраст на момент взятия биопсии 18 и 26 лет (линии клеток, полученные из материала от этих доноров, обозначили FHD1 и FD, соответственно). Биоптаты кожи всех трех отобранных пациентов и здоровых доноров были использованы для получения первичных культур фибробластов (Рисунок 7). Фибробласты культивировали до 3-го пассажа, при этом на первом, втором и третьем пассажах часть культуры подвергали криоконсервации для создания банка первичных клеточных культур.

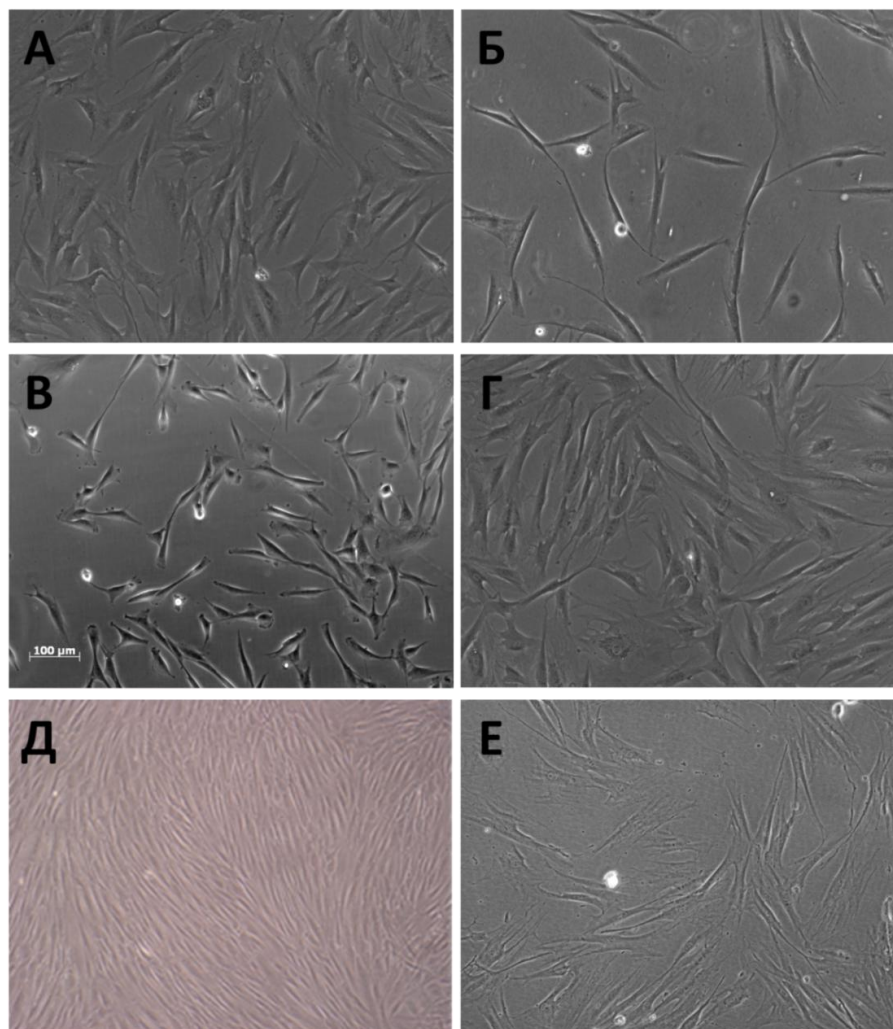


Рисунок 7. Фибробласты кожи пациентов с БП, имеющих мутации в генах *PARK8* и *PARK2*, и здоровых доноров. А – FRG - фибробласты кожи здорового донора, Б – FPD1 - фибробласты кожи пациента с мутацией в гене *PARK8*, В – FPD2 - фибробласты кожи второго пациента с мутацией в гене *PARK8*, Г - FPD1 – фибробласты кожи пациента с мутацией в гене *PARK2*, Д – FHD1 - фибробласты кожи здорового донора, Е – FD - фибробласты кожи здорового донора. Увеличение X100.

Для получения ИПСК с помощью лентивирусной трансдукции использовали лентивирусные векторы, несущие гены Oct4, Sox2, Klf4, с-Мус. Векторы были сконструированы в Институте общей генетики РАН на основе коммерчески доступного вектора LeGO-G2 (<http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm>) (Некрасов Е.Д. с сотр., 2011; Лебедева О.С. с сотр., 2013). Для получения ИПСК с помощью лентивирусной трансфекции использовали фибробласты FRG второго пассажа, фибробласты FD четвертого пассажа, фибробласты FPD1 третьего пассажа, фибробласты FPD2 второго пассажа и фибробласты FPD1 третьего

пассажа. Начиная с 7 дня после инфекции в течение недели клетки обрабатывали «малыми молекулами» VPA и BIX-01294. Используемые низкомолекулярные вещества являются ингибиторами деацетилаз гистонов и метилазы гистонов (селективный ингибитор G9a и G9a-like protein histone lysine methyltransferase), соответственно, их применение повышает эффективность репрограммирования в несколько раз, так как репрограммирование связано с эпигенетическими перестройками в соматических клетках (Huangfu D. et al., 2008a; Shi Y. et al., 2008a). Для всех изученных линий клеток ЭСК – подобные колонии начинали появляться через 14 дней после инфекции лентивирусами. На 20-25 день подросшие колонии механически переносили в среду mTeSR1 на подложку Matrigel. Из 40000 фибробластов, взятых для инфекции лентивирусами, несущими гены «коктейля Яманака», образовывалось около 100 клонов ЭСК-подобных колоний, т.е. эффективность репрограммирования составила 0,2%. Было отобрано по десять клонов каждой линии, отбор производили, основываясь на морфологическом критерии, далее каждый клон культивировали как самостоятельную линию. Только часть отобранных клонов показала способность к стабильному росту в среде для культивирования ЭСК и ИПСК человека mTeSR1 на подложке из матригеля. Линии репрограммированных клеток, которые успешно пролиферировали и пересеивались на среде mTeSR1, размножали и замораживали не менее чем по пять криопробирок на линию. В банк ИПСК помещены следующие линии, полученные методом лентивирусной инфекции: пять линий из материала здорового донора FRG (IPSRG1L, IPSRG2L и т.д.), семь линий из материала пациента FPD1 с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL1.2L, IPSPDL1.3L, и т.д.), четыре линии из материала пациента FPD2 с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL2.2L, IPSPDL2.4L и т.д.), две линии из материала пациента FPD1 с мутацией в гене *PARK2* (IPSPDP1.5L и т.д.), около десяти линий из материала здорового донора FD (IPSFD3.9L и т.д.).

Для получения ИПСК неинтеграционным методом с помощью инфекции вирусом Сендай, использовали фибробласты FRG шестого пассажа, фибробласты FHD1 первого пассажа, фибробласты FPD1 шестого пассажа и фибробласты FPD2 пятого пассажа. Через 24 часа после инфекции все линии фибробластов изменили морфологию, клетки стали более округлыми и менее веретеновидными (Рисунок 8). Через 48 часов инфицированные фибробласты приобрели практически эпителиальную морфологию, т.е. стали распластанными и не имели длинных отростков. Такое изменение морфологии является показателем того, что вирусная инфекция прошла успешно (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/CytoTune_iPS_Reprogramming_Kit_man.pdf). Эффективность получения ИПСК с помощью вируса Сендай оказалась сходной с эффективностью при использовании лентивирусных конструкций (около 0,2%), но колонии, морфологически сходные с ЭСК, начинали появляться

уже на 10 день после инфекции, в то время как при лентивирусной инфекции колонии появились лишь на 14 день.

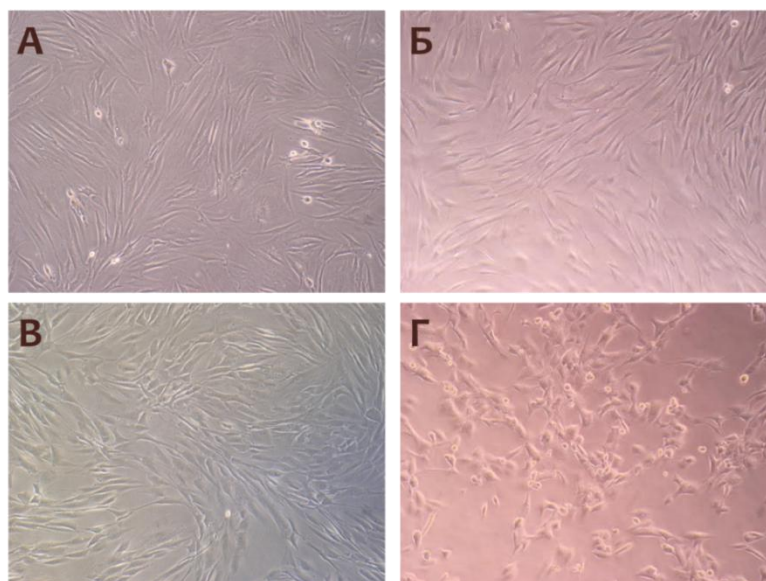


Рисунок 8. Изменение морфологии фибробластов кожи человека после инфекции вирусом Сендай. Фибробласты здорового донора FRG. А, Б – неинфицированные клетки через 24 часа (А) и 48 часов (Б); В, Г – клетки, инфицированные вирусом Сендай, через 24 часа (В) и 48 часов (Г) после инфекции. Увеличение 100Х.

Образовавшиеся колонии механически отбирали и культивировали как самостоятельные линии на подложке из фибробластов крайней плоти человека в среде для плюрипотентных клеток человека в течение первых двух пассажей. Было отобрано 5 клонов ИПСК из материала здорового донора FRG, 5 и 10 клонов ИПСК из материала пациентов FPD1 и FPD2 с мутацией в гене *PARK8*, соответственно. Затем часть клеток пересекали на подложку из матригеля в среду mTeSR1, а часть клеток продолжали вести на среде для плюрипотентных клеток человека и подложке из фибробластов крайней плоти человека. ИПСК из материала здорового донора FHD1 были получены с применением набора реактивов CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit («Invitrogen», США), в качестве фидерного слоя использовали эмбриональные фибробласты мыши. Те клоны, которые показали способность к стабильному росту в среде для культивирования ЭСК и ИПСК человека mTeSR1 на подложке Matrigel, размножали и замораживали не менее чем по пять криопробирок на линию. В банк ИПСК помещены следующие линии, полученные методом инфекции вирусом Сендай: три линии из материала здорового донора FRG (IPSRG4S, и т.д.), пять линий из материала здорового донора FHD1 (IPSHD1.1S и т.д.) две линии из материала пациента FPD1 с мутацией в гене *PARK8*

(IPSPDL1.6S и т.д.), семь линий из материала пациента FPDЛ2 с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL2.2S и т.д.).

ИПСК, полученные методом инфекции вирусом Сендай, на первых пассажах показывали склонность к спонтанной дифференцировке в нейрональном направлении (в культуре присутствовали клетки характерной морфологии с 1-2 длинными отростками), чего не наблюдалось у линий ИПСК, полученных лентивирусным методом. Однако через 4-6 пассажей на среде mTeSR1 эти линии ИПСК стабилизировались. Других различий в морфологии и свойствах клеток при культивировании в среде mTeSR1 на подложке из матригеля выявлено не было. На ранних пассажах ИПСК, полученные с помощью инфекции вирусом Сендай, еще сохраняют вирусную РНК, вероятно, с этим и связаны небольшие отличия клеток, полученных интеграционным и неинтеграционным методами. Через 8-12 пассажей следы вируса Сендай должны окончательно элиминироваться из цитоплазмы репрограммированных клеток (Kudva Y.C. et al., 2012).

Полученные клоны ИПСК морфологически сходны с ЭСК человека: имеют размер порядка 20 мкм, большое соотношение ядро-цитоплазма, растут монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками (Рисунке 9А). Некоторые линии ИПСК, полученные с помощью инфекции вирусом Сендай, были склонны образовывать колонии неправильной формы (угловатые или звездчатые), чего не наблюдалось в линиях ИПСК, полученных методом инфекции лентивирусами. Однако во всех случаях край колонии был ровным и плотные контакты клеток внутри колонии сохранялись. В редких случаях единичные линии ИПСК могут иметь хромосомные аномалии (Soldner F. et al., 2009), в других работах, однако, все линии ИПСК имели нормальный кариотип (Shaltouki A. et al., 2015; Seibler P. et al., 2011). Несмотря на то, что хромосомные мутации являются редким событием при получении ИПСК, выбраковка таких линий из дальнейшего исследования обязательна, т.к. нарушения в кариотипе могут привести к таким изменениям в функционировании клетки, которые будут несовместимы с изучением патогенеза заболевания, скринингом лекарственных средств и, тем более, с клеточной терапией человека. Нами был проведен анализ кариотипа клонов ИПСК методом GTG-дифференциального окрашивания и показано, что все проанализированные клоны ИПСК имеют нормальный кариотип 46 XY (примеры кариограмм на Рисунке 9Б).

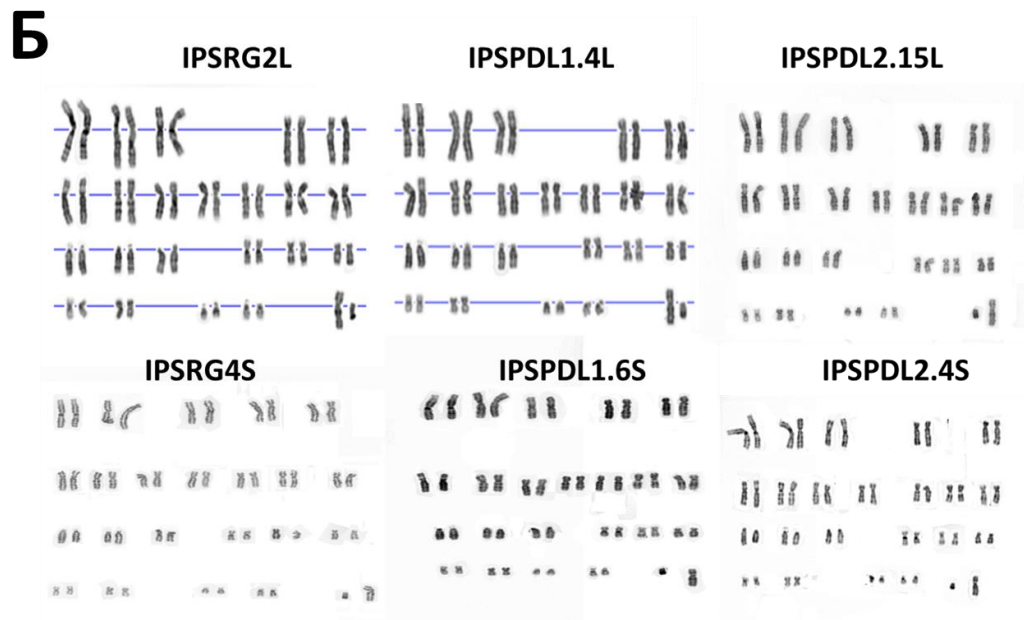
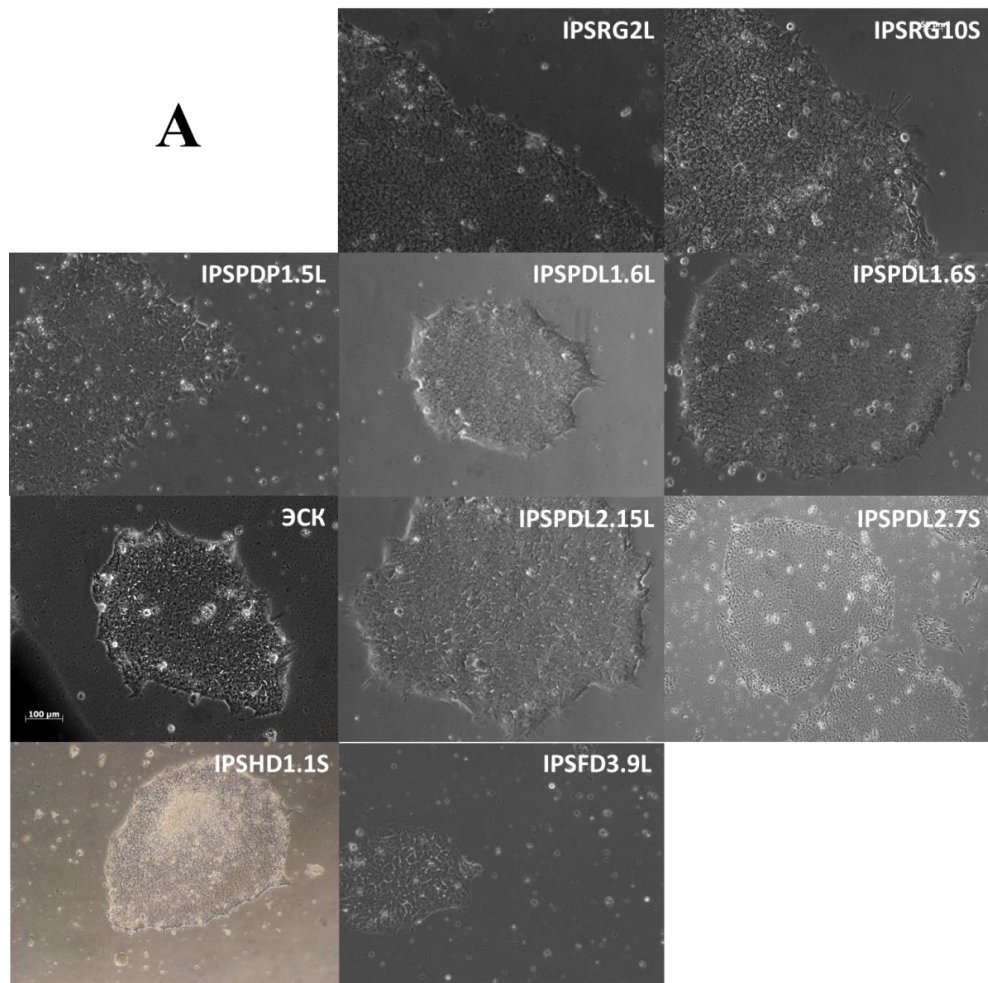


Рисунок 9. Морфология ЭСК линии ES5 и ИПСК человека, полученных разными методами, и примеры кариогамм ИПСК человека. А – микрофотографии колоний ИПСК в сравнении с колонией ЭСК в светлом поле, увеличение 100X. Б – кариогаммы линий ИПСК. IPSRG2L,

IPSPD3.9L – линии ИПСК, полученная из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG4S, IPSRG10S и IPSHD1.1S - линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L, IPSPDL1.4L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S, IPSPDL2.7S и IPSPDL2.4S - линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

В процессе репрограммирования до плюрипотентного состояния происходят значительные изменения в экспрессии генов. Гены, свойственные дифференцированному состоянию клетки, замолкают, и активируются гены поддержания плюрипотентного состояния. Анализ экспрессии маркерных генов (Oct4, Sox2, Nanog, DPPA4, HesX1), отвечающих за поддержание плюрипотентного состояния, в клонах ИПСК проводили методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Для нормировки количества кДНК использовали уровень экспрессии гена домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФД или GAPDH), в качестве отрицательного контроля использовали кДНК фибробластов человека, в качестве положительного контроля кДНК из линии ЭСК человека HUES9. ИПСК, полученные интеграционным методом, как и ИПСК, полученные не интеграционным методом, экспрессировали мРНК генов поддержания плюрипотентного состояния на уровне, сопоставимом с ЭСК человека, а экспрессия мРНК этих генов в исходных линиях фибробластов отсутствовала (Рисунок 10).

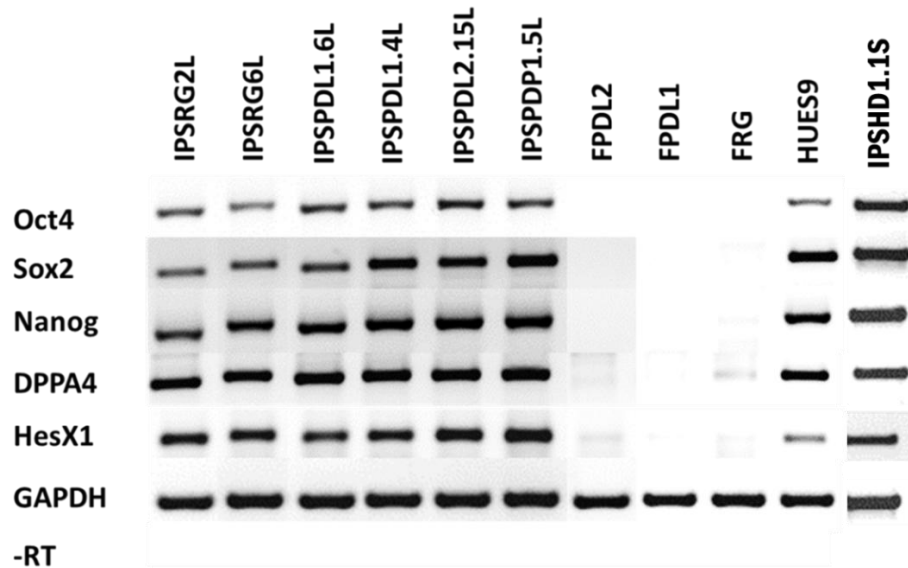


Рисунок 10. Сравнение экспрессии ряда генов, характерных для плюрипотентного состояния, в полученных линиях ИПСК, исходных линиях фибробластов кожи человека и ЭСК методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. IPSRG2L, IPSRG6L и IPSHD1.1S – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров; IPSPDL1.6L, IPSPDL1.4L и IPSPDL2.15L – линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*; IPSPDP1.5L – линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*.

Все полученные линии ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния и на уровне белка. Все отобранные для анализа клоны ИПСК специфично окрашивались антителами на Oct4, Nanog, TRA-1-81 и SSEA-4 (Рисунок 11).

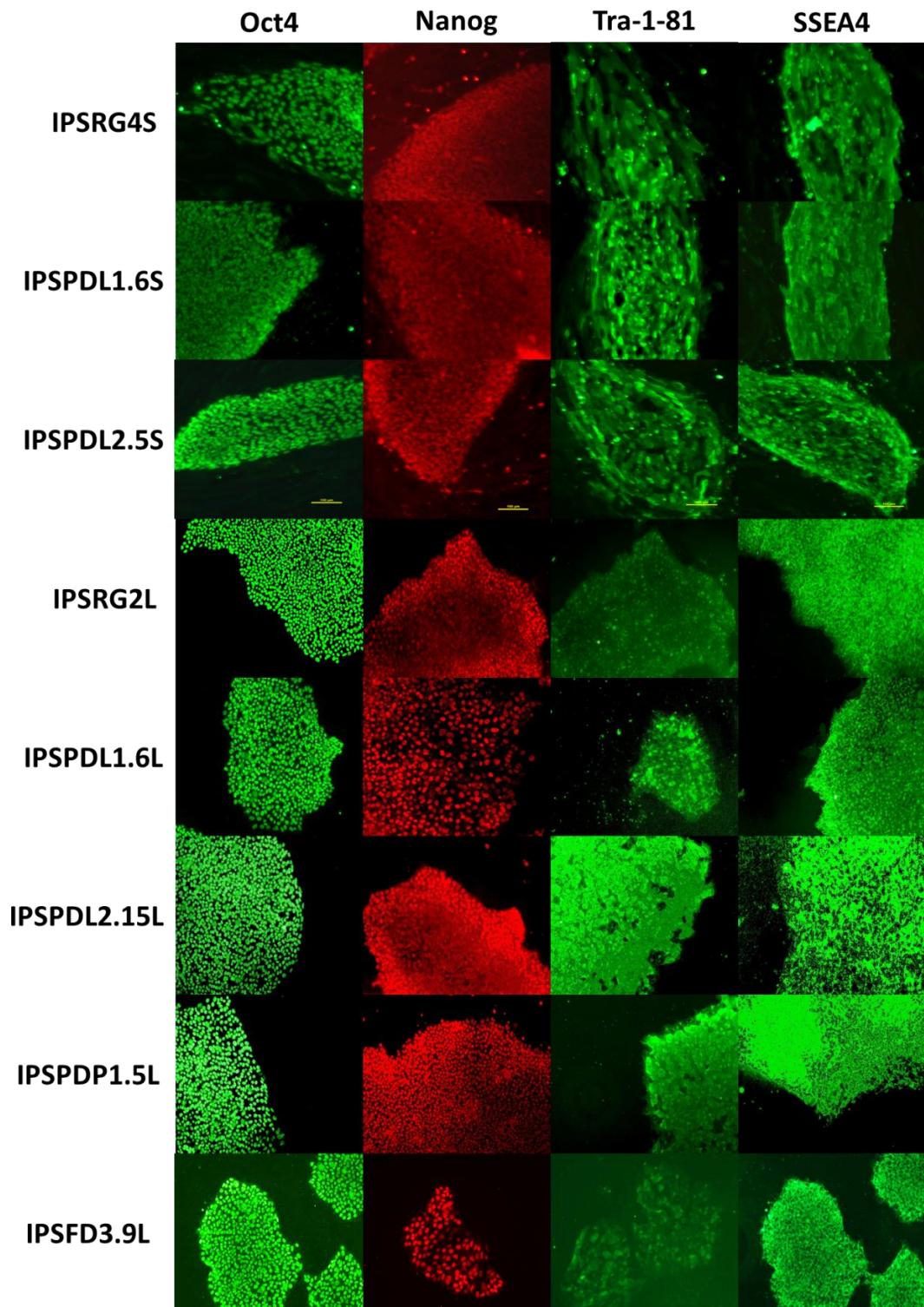


Рисунок 11. Сравнение экспрессии маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Tra-1-81 и SSEA4, в линиях ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, методом иммуноцитохимии. IPSRG2L и IPSFD3.9L – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG4S - линия ИПСК, полученная из материала здорового донора с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.5S -

линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции. Увеличение 100X.

Необходимым условием для работы с ИПСК, полученными интеграционным методом, является замолкание трансгенов, т.к. конститутивная экспрессия факторов репрограммирования может повлиять на способность ИПСК к дифференцировке. Для проверки замолкания трансгенов были подобраны праймеры, специфически узнающие экзогенную мРНК, таким образом, что прямой праймер лежал на последовательности кДНК фактора репрограммирования, а обратный праймер соответствовал последовательности лентивирусного вектора, которая транскрибировалась в РНК. Методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что в ИПСК, полученных интеграционным методом, отсутствует экспрессия трансгенных Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, а наблюдаемая экспрессия данных транскрипционных факторов происходит с генома репрограммированных клеток (Рисунок 12).

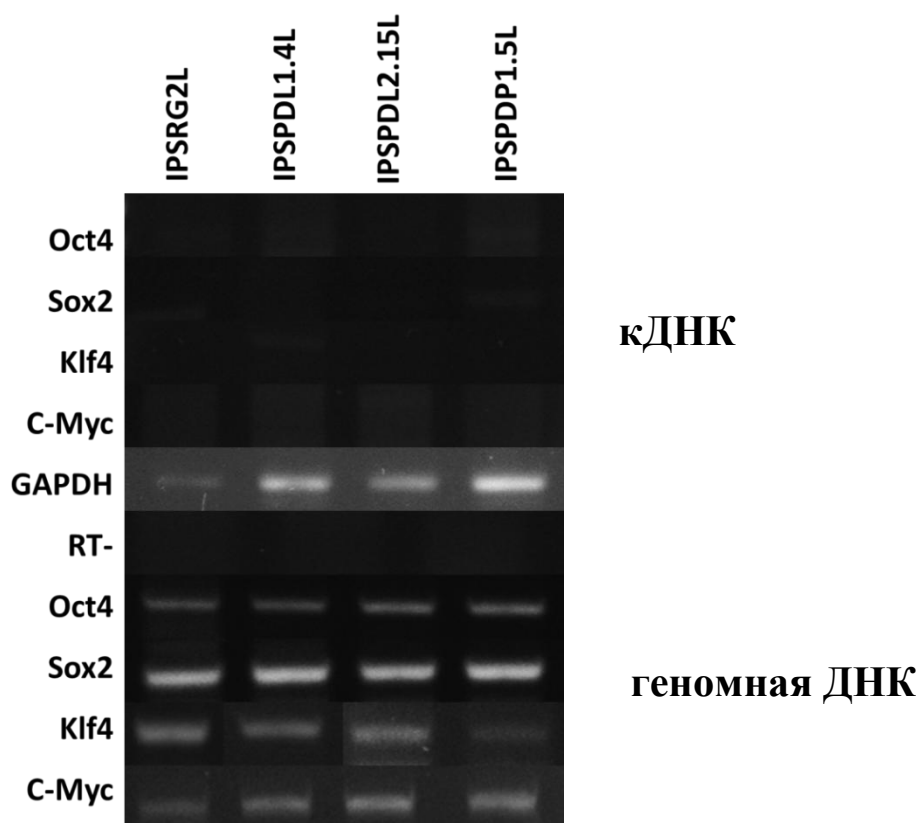


Рисунок 12. ПЦР-анализ на замолкание трансгенов в линиях ИПСК, полученных интеграционным методом. IPSRG2L – линия ИПСК, полученная из материала здорового

донора; IPSPDL1.4L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*.

Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса клонов ИПСК, полученных из фибробластов кожи человека, нами был использован тест на формирование клетками эмбрионидных телец, а также анализ их последующей дифференцировки в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам. Из клонов ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, были получены эмбрионидные тельца (Рисунок 13А), которые через 10-20 дней культивирования в суспензии были переведены на культивирование в адгезионной форме. В результате такой спонтанной дифференцировки образовались клетки различной морфологии, а в некоторых случаях наблюдались спонтанно сокращающиеся кластеры кардиомиоцитов. Через три недели после начала культивирования в адгезионной форме клетки фиксировали и проводили окрашивание с использованием антител к маркерам трех зародышевых листков (Рисунок 13Б). В культуре спонтанно дифференцировавшихся ИПСК присутствовали клетки, положительно окрашивающиеся на маркеры эктодермы (панцитокератин, β -III-тубулин), мезодермы (CD105, тропомиозин) и энтодермы (α -фетопротеин). Таким образом, полученные ИПСК способны дифференцироваться в клетки – производные трех зародышевых листков, что подтверждает их свойство плюрипотентности. Способность к спонтанной дифференцировке не зависела от способа получения линий ИПСК.

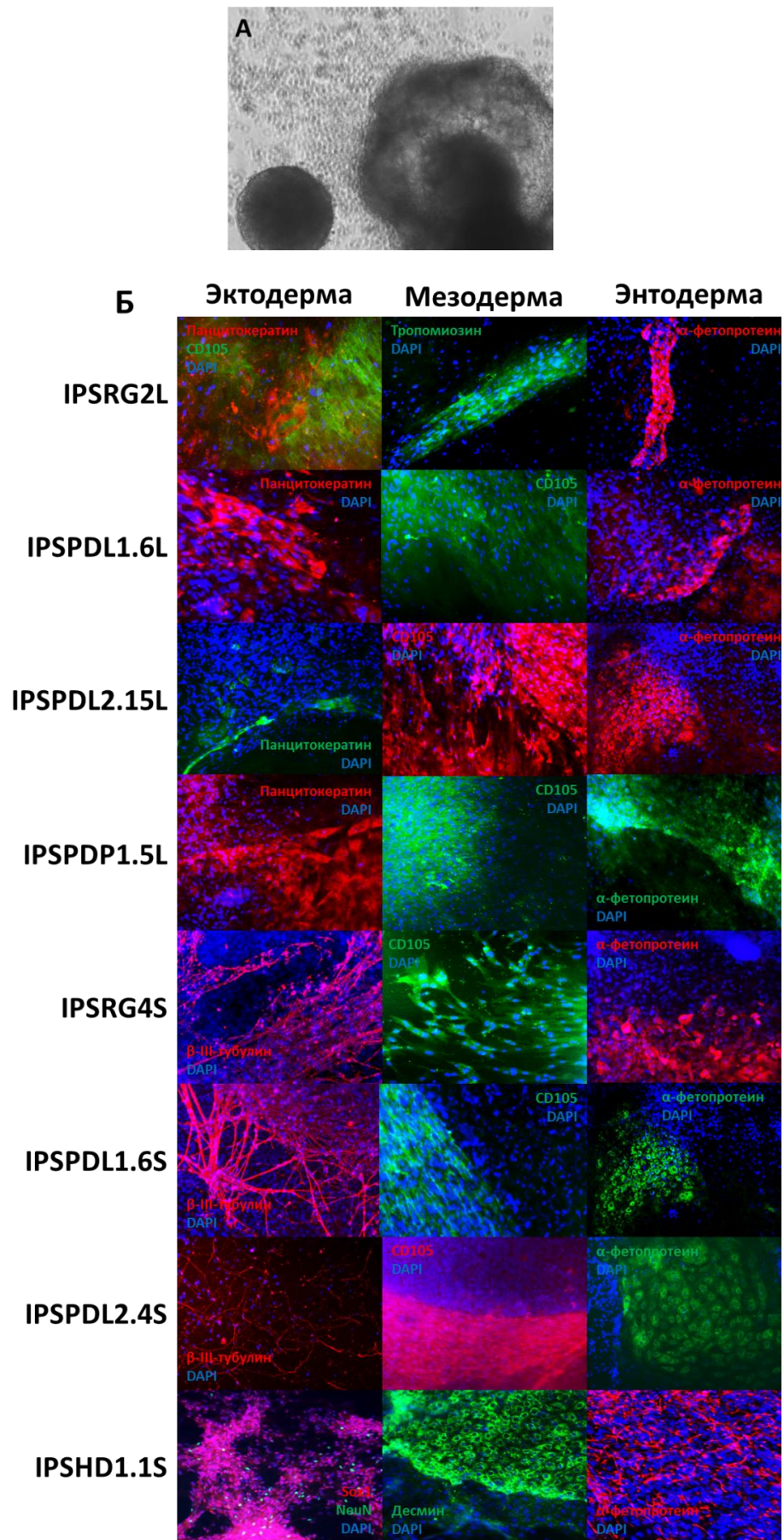


Рисунок 13. Анализ дифференцированных производных ИПСК на формирование клеток-производных, принадлежащих ко всем трем зародышевым листкам. А — характерная

морфология эмбрионидных телец, сформированных ИПСК человека, через неделю суспензионного культивирования. Б - микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания дифференцированных ИПСК антителами к маркерам эктодермы (панцитокератин, β -III-тубулин, Sox1, NeuN), мезодермы (CD105, тропомиозин, десмин) и энтодермы (α -фетопротейн), увеличение 100X. IPSRG2L – линия ИПСК, полученная из материала здорового донора с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG4S и IPSHD1.1S - линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.4S - линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

В настоящее время разработаны высокоэффективные протоколы репрограммирования с использованием лентивирусных конструкций, эффективность которых доходит до 10%. Однако, для достижения такой эффективности требуется специальная конструкция лентивирусного вектора и особое сочетание малых молекул – ингибиторов ферментов, модифицирующих хроматин. Достижение высокой эффективности репрограммирования крайне важно при работе с материалом пациентов, страдающих от заболеваний, которые влияют на способность клеток к репрограммированию (Groß B. et al., 2013; Müller L.U.W. et al., 2012), однако, для решения поставленных в данной работе экспериментальных задач, эффективность репрограммирования 0,2%, достигнутая с помощью лентивирусных векторов, была вполне приемлема. Такой же эффективности репрограммирования удалось достигнуть и при использовании векторов для доставки репрограммирующих факторов на основе вируса Сендай. Преимуществом вируса Сендай является отсутствия модификаций в геноме получаемых линий ИПСК и возможность отобрать клоны быстрее, чем при лентивирусной инфекции. Метод, тем не менее, не лишен недостатков. При использовании стандартных векторов на основе вируса Сендай второго поколения вирусный геном из репрограммированных клеток полностью элиминируется только после определенного числа пассажей (8-12) (Kudva Y.C. et al., 2012). При стандартном режиме культивирования ИПСК проходят такое число пассажей за 2 месяца, что является достаточно длительным сроком при работе в столь конкурентной области, как биология плюрипотентных клеток человека. Использование чувствительных к температуре векторов на основе вируса Сендай позволяет значительно ускорить элиминацию вирусного

генома (Ban H. et al., 2011). Использование лентивирусных векторов привлекательно их доступностью, практически любая лаборатория имеет возможность собирать лентивирусные частицы с высоким титром в упаковочных клетках. Вирус Сендай, несмотря на все свои преимущества, все еще не так распространен в лабораторной практике из-за своей дороговизны, а получать вирусные частицы в обычной лаборатории затруднительно, так как наиболее эффективной системой для продукции вируса Сендай являются куриные эмбрионы.

По сравнимым параметрам интеграционные и неинтеграционные ИПСК не отличаются друг от друга. В работе Soldner F. с соавторами проводили сравнение ИПСК от пациентов со спорадической формой БП до и после удаления трансгенов с помощью Cre-рекомбиназы. Различий на уровне морфологии и способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков обнаружено не было, однако при транскриптомном анализе было обнаружено, что ИПСК, трансгены из которых удалены, более сходны с ЭСК, чем ИПСК, имеющие вставки в геноме (Soldner F. et al., 2009). В работах, связанных с получением ИПСК с помощью инфекции лентивирусами или с помощью инфекции вирусом Сендай, не выявлены отличия между ЭСК и ИПСК по морфологии, экспрессии маркеров плюрипотентности и способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков (Shaltouki A. et al., 2015; Liu G.-H. et al., 2012; Seibler P. et al., 2011), что согласуется с результатами, полученными в данной работе.

Все полученные клоны ИПСК были охарактеризованы согласно общепринятым стандартам. Все линии имели нормальный кариотип, линии, полученные от пациентов с БП, содержали в своем геноме соответствующие мутации. Все линии ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния на уровне сопоставимом с ЭСК человека (по данным ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического анализа). Все линии ИПСК продемонстрировали способность к образованию эмбриоидных тел и последующей дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Таким образом, плюрипотентность, полученных в ходе исследования, линий ИПСК была подтверждена молекулярном и функциональном уровнях.

3.2. Изучение влияния интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования на метилирование ДНК в ИПСК человека

Использование ретро или лентивирусной системы доставки генетического материала в клетки приводит к интеграции вирусных последовательностей в геном. Отсутствие специфических мест интеграции ретровирусов может приводить к активации ранее молчащих протоонкогенов и трансформации клеток (Thrasher A.J. et al., 2006) за счет непосредственного действия вирусных регуляторных последовательностей или изменения эпигенетического статуса района интеграции. Более того, в случае репрограммирования до плюрипотентного состояния, вводимые в геном клетки, гены транскрипционных факторов зачастую находятся под контролем убиквитарных промоторов (вирусный LTR, CMV, SFFV), которые инактивируются эпигенетически при достижении клеткой плюрипотентного состояния. Однако, не исключено, что при дальнейшей дифференцировке и, соответственно, изменении эпигенетического статуса, промоторные последовательности могут активироваться, что приведет к экспрессии транскрипционных факторов плюрипотентности и возможной трансформации клетки. В связи с этим была поставлена задача определения с помощью современных методов полногеномных исследований влияния интеграции вирусных векторов на метилирование ДНК во время репрограммирования. Ответить на вопрос о влиянии интеграций в геном на метилирование ДНК можно с помощью полногеномного анализа метилирования изогенных линий ИПСК, полученных из материала одного донора с помощью интеграционного метода репрограммирования (лентивирусная доставка 4х факторов) и неинтеграционного (доставка тех же факторов с помощью вируса Сендай).

Для анализа нами были использованы линии ИПСК, которые по своим морфологическим, молекулярно-биологическим, а также функциональным свойствам были полностью идентичны и соответствовали критерию ИПСК.

Для полногеномного анализа метилирования ДНК были выбраны 4 линии ИПСК от здорового донора, полученные как интеграционным (IPSRG2L, IPSRG6L), так и неинтеграционным (IPSRG4S, IPSRG10S) методами, 2 линии ИПСК от пациента с мутацией в гене *PARK8*, полученные интеграционным (IPSPDL2.15L) и неинтеграционным (IPSPDL2.9S) методами, а также нейрональные популяции, обогащенные ТН-положительными нейронами, дифференцированные из ИПСК, полученных интеграционным методом от здорового донора (IPSRG2L) и двух пациентов с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L). Недифференцированные ИПСК от здорового донора были представлены в анализе на двух разных пассажах: IPSRG2L на 10 и 26 пассажах, IPSRG6L на 15 и 27 пассажах, IPSRG4S на 11 и

22 пассажах, кроме линии IPSRG10S, для которой был проанализирован только 10 пассаж; обе линии недифференцированных ИПСК от пациента с мутацией в гене *PARK8* исследовали на 15 пассаже, нейрональные культуры были взяты в анализ на 38 день дифференцировки. Необходимость исследования ИПСК на разных пассажах обусловлена тем, что паттерн метилирования может изменяться в зависимости от времени, проведенного в культуре (Nishino K. et al., 2011).

Выделенную геномную ДНК подвергали бисульфитной конверсии и гибридизовали с Infinium 450K BeadChips (Illumina, Inc.), затем сканировали прибором iScan (Illumina, Inc.). Качество данных проверяли в программе GenomeStudio. Beta-value и p-value для каждого образца загружали в программу IMA R (<http://cran.r-project.org/>), данные обрабатывали в этой программе. Для поиска различий в индивидуальных сайтах CpG мы использовали следующие критерии: разница средних значений между группами образцов $>0,2$; уровень значимости детекции p-value < 0.01 ; параметр наличия ложных результатов по тесту Бенджамини-Хочберг q-value < 0.05 .

В тотипотентных и плюрипотентных клетках эпигенетические метки менее стабильны и более пластичны. Однако в процессе развития клеточные потенции становятся все более и более ограниченными, а эпигенетические метки все более устойчивыми. Перед гастрულიей волна глобального метилирования *de novo* устанавливает общую картину метилирования, характерную для взрослого организма и поддерживаемую в дальнейшем в соматических клетках на протяжении всей жизни (Dean W. et al., 2003). В плюрипотентных клетках снижен уровень метилирования промоторов, содержащих CpG-островки, и повышен уровень метилирования промоторов, бедных CpG (Meissner A. et al., 2008). Промоторы генов, связанных с поддержанием плюрипотентности (Oct4 и Nanog), гипометилированы в недифференцированных ЭСК и ИПСК и гиперметилированы в их дифференцированных производных и соматических клетках (Hattori N. et al., 2004; Takahashi K. et al., 2006; Hattori N. et al., 2007). При потере клеткой плюрипотентности в ходе дифференцировки или эмбрионального развития промоторы генов поддержания плюрипотентности подвергаются метилированию, которое осуществляется ДНК-метилтрансферазами DNMT1, DNMT3A и DNMT3B (Li J.Y. et al., 2007).

Для сравнения полногеномных паттернов метилирования ДНК в ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, был проведен биоинформационный корреляционный анализ данных по метилированию ДНК (Рисунок 14). В анализе сравнивали недифференцированные линии ИПСК, полученные от двух разных доноров разными методами, и их дифференцированные производные (ТН-положительные нейроны). Наименьшая корреляция была обнаружена между нейронами и их исходными линиями ИПСК. Причем

корреляция внутри каждого типа клеток значительно выше, не смотря на то, что в анализе присутствовал материал от двух доноров. Эти данные свидетельствуют о том, что различия в паттернах метилирования плюрипотентных клеток и их дифференцированных производных являются более глобальными, чем индивидуальные различия доноров клеточного материала и линий ИПСК. Исследованные линии ИПСК разделились на кластеры согласно их происхождению от конкретного донора. При этом линия IPSRG6L, полученная интеграционным методом и линия IPSRG4S, полученная неинтеграционным методом, коррелируют между собой сильнее, чем с линией IPSRG2L, полученной интеграционным методом от того же пациента. Результаты свидетельствуют о том, что метод репрограммирования не влияет на паттерн метилирования ДНК ИПСК, имеющих один генетический фон. Наиболее высокая корреляция наблюдалась между ранним (10-15) и поздним (22-27) пассажами одной линии ИПСК, что свидетельствует об индивидуальности конкретной линии ИПСК.

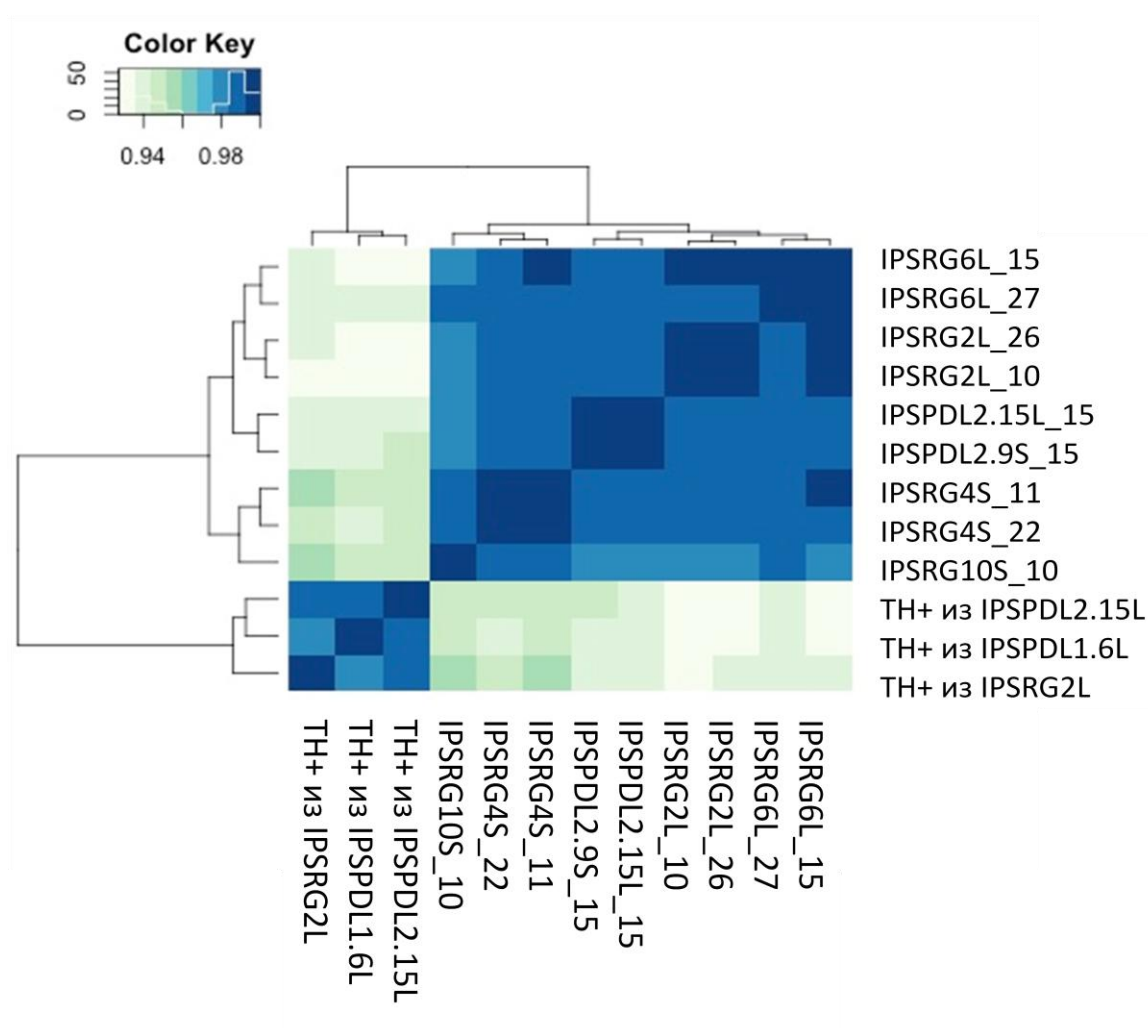


Рисунок 14. Корреляционный анализ (метод корреляций по Пирсону) полногеномных паттернов метилирования ДНК в линиях ИПСК, полученных интеграционным и

неинтеграционным методами, и их дифференцированных производных. IPSRG2L, IPSRG6L, IPSRG4S, IPSRG10S - линии ИПСК, полученные от здорового донора, IPSPDL2.15L, IPSPDL2.9S - линии ИПСК, полученные от пациента с мутацией в гене *PARK8*, TH⁺ из IPSRG2L - дофаминергические нейроны дифференцированные из линии ИПСК, полученной от здорового донора. TH⁺ из IPSPDL1.6L, TH⁺ из IPSPDL2.15L - дофаминергические нейроны дифференцированные из линий ИПСК, полученных от пациентов с мутацией в гене *PARK8*. Числа после названия линий соответствуют пройденным ими пассажам.

Ранее в работе Bhutani K. с соавторами (Bhutani K. et al., 2016) были исследованы 9 изогенных линий ИПСК, полученных с помощью разных методов доставки факторов репрограммирования (лентивирусный вектор, вектор на основе вируса Сендай и синтетическая мРНК факторов репрограммирования). Были проанализированы однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции и делеции, на полногеномном уровне. Было показано, что в репрограммированных клетках присутствуют однонуклеотидные полиморфизмы, которые не были обнаружены в исходной линии фибробластов, однако их паттерн и количество не зависели от способа доставки факторов репрограммирования. Данное исследование является первым исследованием, в ходе которого был проанализирован полногеномный паттерн метилирования ДНК в ИПСК, полученных различными методами. Проведенный метиломный анализ показал значительное сходство линий ИПСК, полученных различными методами, между собой, что позволяет нам утверждать, что в целом полногеномный паттерн метилирования не зависит от способа получения ИПСК. Таким образом, любые полученные нами линии ИПСК могут применяться для моделирования БП, т.к. их плюрипотентный статус и полнота процесса репрограммирования полностью подтверждены.

3.3. Сравнительное исследование условий культивирования фибробластов и ИПСК, полученных от здорового донора и пациентов с БП

Фибробласты кожи, полученные от здоровых доноров и от пациентов с БП, имели одинаковую морфологию. На рисунке 7 приведены микрофотографии фибробластов кожи от пациента с мутацией в гене *PARK2*, от двух пациентов с мутацией в гене *PARK8* и от трех здоровых доноров. Клетки здоровых доноров, как и клетки всех трех пациентов, в основном имеют веретеновидную форму, хотя встречаются и клетки с несколькими отростками. Выход фибробластов из всех биоптатов начался через одинаковый промежуток времени после взятия

биоматериала – 4-6 дней. При посеве клеток с видимой плотностью 50% фибробласты всех линий достигали видимой плотности 100% через 3-4 дня. Эти наблюдения позволяют сделать вывод, что наличие мутаций в генах *PARK8* и *PARK2* не влияет на способность фибробластов кожи расти в условиях *in vitro* и способность к миграции, а также на их выживаемость и пролиферативную активность.

Для подтверждения того, что полученные линии ИПСК были репрограммированы именно из клеток пациентов с БП, было проведено исследование по подтверждению наличия мутаций, описанных у доноров биологического материала. Для обнаружения каждой мутации были подобраны специфические праймеры для амплификации с геномной ДНК, отстоящие от места мутации на 200-250 п.о. Из отобранных для анализа линий ИПСК выделили геномную ДНК методом фенол-хлороформной экстракции (Маниатис Т. с соавт., 1984) и провели ПЦР с соответствующими праймерами. Амплифицировавшийся фрагмент геномной ДНК секвенировали. По результатам секвенирования была обнаружена замена 6055 G>A (G2019S) в 41 экзоне гена *PARK8* (двойной пик гуанина и аденина в одном положении на гистограмме, приведенной на рисунке 15А). Замена IVS1+1G/A в сплайс-донорном сайте 1 интрона гена *PARK2* также была обнаружена (двойной пик гуанина и аденина в одном положении на рисунке 15Б). Для детекции делеции 202-203 AG во втором экзоне гена *PARK2*, как и в предыдущих случаях, были использованы праймеры, которые отжигаются на двух аллелях, в результате чего наличие делеции в одной из них приводит к сбою сиквенса после места мутации (Рисунок 15В). Эти результаты подтверждают, что линии ИПСК содержат мутации, обнаруженные у пациентов, и являются производными исходных линий фибробластов.

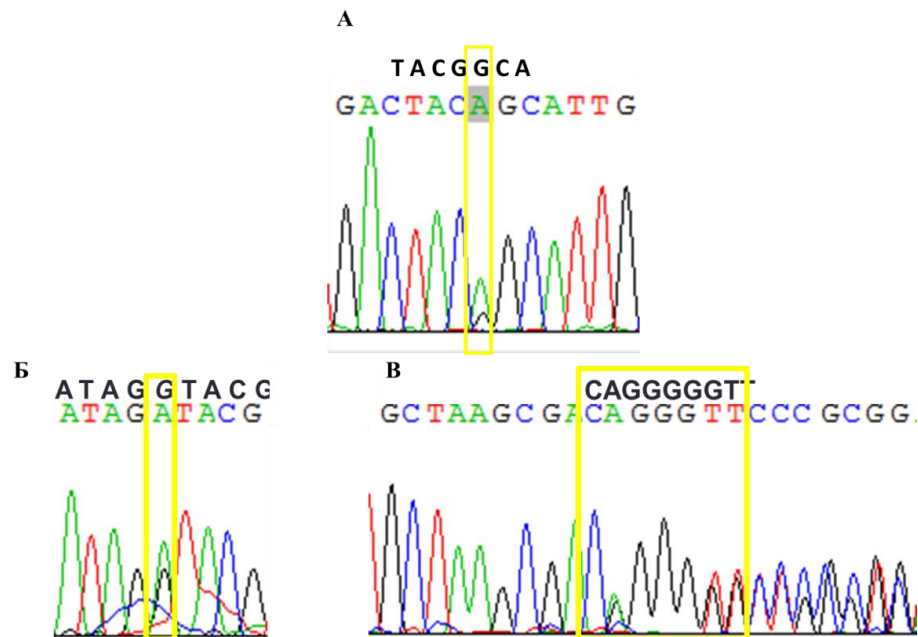


Рисунок 15. Анализ мутаций в линиях ИПСК, больных БП. А – мутация 6055 G>A (G2019S) в 41 экзоне гена *PARK8* (хромосома 12q12); Б - мутация IVS1+1G/A в сплайс-донорном сайте 1 интрона гена *PARK2* (хромосома 6q25.2-27); В – делеция 202-203 AG во втором экзоне гена *PARK2* (хромосома 6q25.2-27). Желтым прямоугольником обозначено место мутации.

При репрограммировании контрольных фибробластов и фибробластов, несущих мутации в генах *PARK8* и *PARK2* эффективность репрограммирования не зависела от наличия мутации, и составляла около 0,2% для всех исследованных линий фибробластов. Как в случае с индукцией плюрипотентности с помощью лентивирусных конструкций, так и при применении конструкций на основе вируса Сендай разница в динамике и эффективности репрограммирования между мутантными и контрольными клетками отсутствовала, что свидетельствует о том, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияли на процесс репрограммирования.

Различий в морфологии между ИПСК от здорового донора и от пациентов с мутациями в генах *PARK8* и *PARK2* обнаружено не было (Рисунок 9А). Между линиями ИПСК наблюдались различия по пролиферативной активности (Рисунок 16). Такие различия, вероятно, обусловлены свойствами конкретной линии (местом встройки лентивирусного вектора и/или генетическим фоном донора биологического материала), а не наличием мутации или способом получения ИПСК, так как нельзя выделить группу «быстро» или «медленно» растущих клеток, объединенную по одному из этих параметров. Кроме того, как ИПСК, несущие мутации, так и ИПСК здорового донора экспрессировали все исследованные нами маркеры плюрипотентности

(Рисунок 10 и 11). Таким образом, способность к поддержанию плюрипотентного состояния ИПСК не зависит наличия в клетках мутаций в генах *PARK8* и *PARK2*.

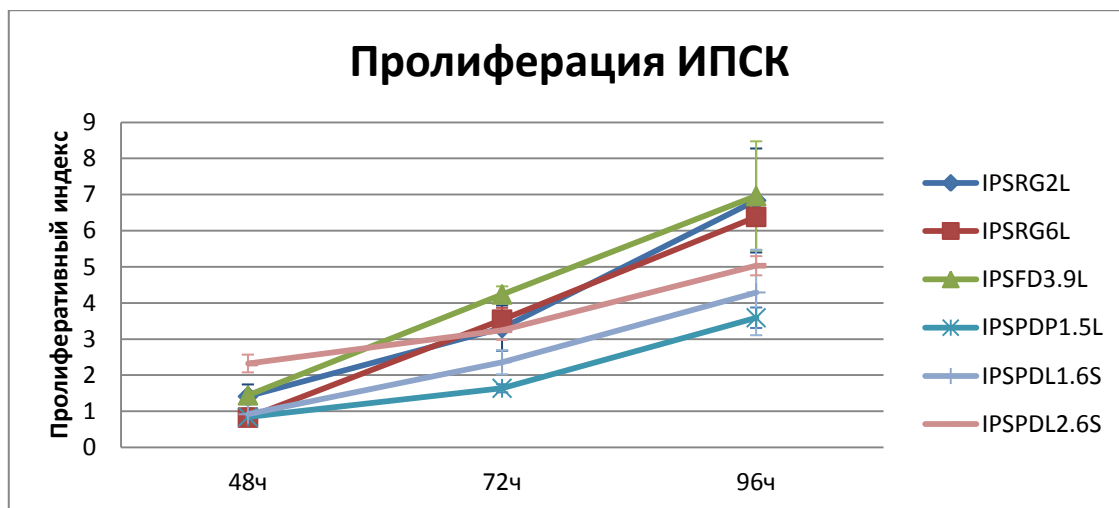


Рисунок 16. Кривые роста линий ИПСК, полученных от здоровых доноров и пациентов с БП интеграционным и неинтеграционным методами (для каждой точки $n=3$). IPSRG2L, IPSRG6L, IPSFD3.9L – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.6S – линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L – линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

Из клонов ИПСК от всех трех пациентов и от здоровых доноров были получены эмбриоидные тельца, которые через 10-20 дней культивирования в суспензии были переведены на культивирование в адгезионной форме. Способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков была характерна для всех линий ИПСК (Рисунок 13). Спонтанной дифференцировке через стадию образования эмбриоидных тел были подвергнуты все, полученные в ходе работы, линии ИПСК, и склонности какой-либо линии дифференцироваться по определенному пути не наблюдалось. Потенциал к дифференцировке не зависел от способа получения ИПСК, а также на него не оказывали влияния мутации в генах *PARK8* и *PARK2*. Представленные результаты свидетельствуют о том, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияют на способность клеток к репрограммированию и на некоторые изученные свойства получаемых линий ИПСК. Другие авторы, исследующие наследственные формы БП на моделях, основанных на ИПСК, показали, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияли на

процесс репрограммирования и свойства мутантных ИПСК (Reinhardt P. et al., 2013; Jiang H. et al., 2012). Кроме того, не было обнаружено влияния мутаций в генах, кодирующих PINK1 и α -синуклеин на свойства ИПСК (Seibler P. et al., 2011; Byers B. et al., 2011). Однако следует отметить, что соматические клетки от пациентов с некоторыми наследственными заболеваниями поддаются репрограммированию со значительно меньшей эффективностью, чем клетки здорового донора. Ярким представителем такого заболевания является анемия Фанкони, редкое наследственное заболевание, вызванное мутацией в генах репарации ДНК. В этом случае при репрограммировании приходится прибегать к дополнительным трудоемким манипуляциям, таким как внесение в геном мутантных клеток последовательности поврежденного гена дикого типа и культивирование при пониженном содержании O_2 . (Müller L.U.W. et al., 2012).

3.4. Разработка эффективного и воспроизводимого протокола дифференцировки ИПСК в тирозингидроксилаза-положительные нейроны

При разработке протокола направленной дифференцировки мы опирались на протокол, опубликованный Kriks S., et al. в 2011 году (Kriks S. et al. 2011). При доскональном повторении опубликованного протокола нам не удалось достигнуть заявленной эффективности дифференцировки в 80% TH-положительных нейронов. Возможно, причина была в том, что мы использовали культуральные среды и факторы роста от других производителей. Кроме того, в опубликованном протоколе дифференцировка ИПСК начиналась после подращивания клеток в среде, кондиционированной на эмбриональных фибробластах мыши. Мы поставили перед собой задачу исключить этот этап, связанный с использованием компонентов животного происхождения неопределенного состава. Для этого перед дифференцировкой ИПСК подращивали в коммерчески доступной среде для плюрипотентных клеток человека mTeSR1, что потребовало изменения времени инкубации с различными факторами дифференцировки. В опубликованном ранее протоколе используется 8 сред различного состава, тогда как в разработанном нами протоколе применяется всего 3 различных среды, что значительно упрощает применение данного протокола. Также нами был введен дополнительный этап пересева и/или заморозки нейрональных предшественников, что позволило банкировать нейрональные предшественники на разных стадиях дифференцировки и, таким образом, экономить дорогостоящие белковые факторы роста и дифференцировки.

Протокол дифференцировки состоял из трех этапов (Рисунок 17). Перед началом дифференцировки ИПСК человека культивировали до достижения 70-80% видимой плотности

в среде mTeSR1 и на подложке Matrigel. Индукция нейрональной дифференцировки основана на двойном ингибировании сигнального пути SMAD (Chambers S.M. et al., 2009), поэтому на первом этапе среду клеткам заменяли на среду для нейрональной дифференцировки (см. материалы и методы), содержащую 80 нг/мл Noggin, 10 мкМ SB431542, 4 мкМ дорсоморфина. Как было показано в экспериментах на эмбрионе лягушки ингибитор сигнального каскада BMP - Noggin - является одним из основных индукторов образования нервной пластинки в организаторе Шпемана (Smith W.C. et al., 1992). SB431542 ингибирует сигнальные пути Lefty/Activin/TGF β , блокируя фосфорилирование рецепторов ALK4, ALK5, ALK7 (Smith J.R. et al., 2008). Механизм синергического действия Noggin и SB431542 основан на дестабилизации поддерживающей плюрипотентность сигнальной сети, в которой участвуют активин и Nanog, ингибировании индуцированной BMP дифференцировки в трофобласт, запрете дифференцировки по мезо- и энтодермальному пути через ингибирование эндогенных сигналов активина и BMP, нейтрализации примитивной эктодермы с помощью ингибирования BMP. Низкомолекулярное вещество дорсоморфин является ингибитором пути BMP (Yu P.B. et al., 2008). Использование дорсоморфина позволяет частично заменить дорогостоящий белковый фактор Noggin и увеличить эффективность дифференцировки. Noggin и SB431542 детерминируют дифференцировку клеток в сторону передней части нервной трубки, из которой впоследствии разовьются передние отделы центральной нервной системы. Используя описанный набор индукторов нейральной дифференцировки, нам удалось получить практически чистую популяцию нейрональных предшественников, фенотипически соответствующих клеткам нервной трубки (Рисунок 17, справа вверху). Ранние нейральные предшественники представляют собой мелкие клетки, растущие плотно в несколько слоев и зачастую образующие трехмерные структуры в виде замкнутых валиков клеток с углублением в середине – нейрональные розетки. Клеток с отличной морфологией, например, плоских монослойных эпителиальных клеток или фибробластоподобных распластанных клеток, в культуре практически не обнаруживается. Высокая степень чистоты популяции позволяет избежать присутствующего во многих протоколах нейрональной дифференцировки этапа механического отбора нейральных розеток. Механический отбор нейральных розеток проводят вручную с помощью тонкого скальпеля или иглы от шприца под визуальным контролем с помощью микроскопа. В нашем протоколе данный трудоемкий и затратный по времени процесс заменен быстрым и дешевым пересевом нейральных предшественников с помощью раствора Версена, который позволяет получать гомогенную суспензию нейральных предшественников. Вместо раствора Версена можно также использовать энзиматические методы посева клеток, например, такие ферменты, как трипсин или аккутаза, однако метод посева с помощью раствора Версена представляется нам менее травматичным для клеток (отсутствует

повреждение поверхностных белков протеолитическими ферментами, не требуется отмывка клеток от фермента, связанная с несколькими последовательными центрифугированиями). На этой стадии образуются общие нейральные предшественники, которые способны при дальнейшей дифференцировке давать все типы нейронов и глиальных клеток. Такие предшественники легко переносят заморозку и могут храниться в жидком азоте. Эффективность получения нейральных предшественников крайне высока, из $1-2 \times 10^6$ запущенных в дифференцировку ИПСК по прошествии 14 дней первого этапа протокола нейрональной дифференцировки удастся получить около 10×10^6 клеток-предшественников.

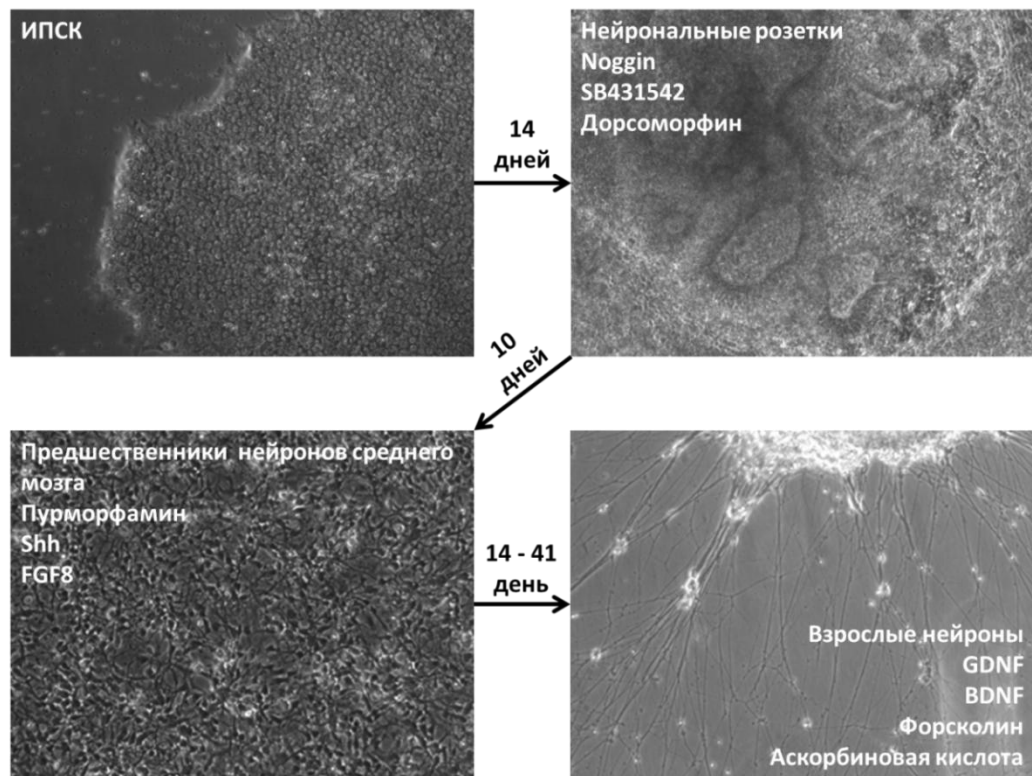


Рисунок 17. Схема протокола дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны. Сверху слева – недифференцированные ИПСК в среде mTeSR на подложке Matrigel; сверху справа – общие нейральные предшественники в конце первого этапа дифференцировки; снизу слева – нейрональные предшественники среднего мозга в конце второго этапа дифференцировки; снизу справа – взрослые нейроны на третьем этапе дифференцировки. Увеличение 100X.

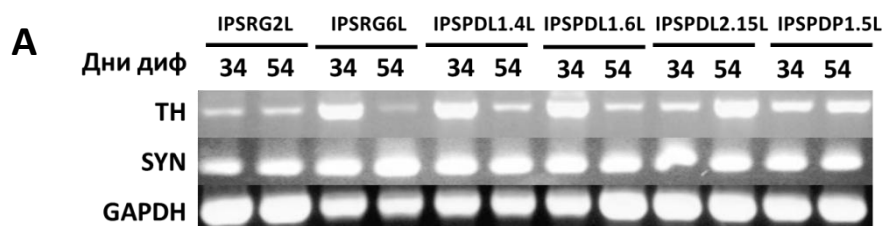
В ходе развития нервной трубки происходит ряд событий, ведущих к усложнению её пространственной организации и, соответственно, её клеточного состава. После замыкания нервной трубки начинается активное деление ее клеток, и нервная трубка становится

многослойной. Неравномерное деление клеток в передней части нервной трубки приводит к образованию трех мозговых пузырей. Затем передний и задний мозговые пузыри подразделяются на два вторичных пузыря, таким образом, мозговых пузырей становится пять. Одновременно с разрастанием и утолщением нервной трубки происходит её изгибание необходимое для «укладки» формирующегося мозга в черепной коробке. За специализацию дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга отвечают Sonic hedgehog (Shh) и фактор роста фибробластов 8 (FGF8). Shh выделяется донной пластинкой и отвечает за вентрализацию клеток среднего мозга, FGF8 экспрессируется на границе между промежуточным и задним мозгом и образует каудо-ростральный градиент (Gilbert S.F., 2003; Wurst W., Bally-Cuif L., 2001). Поэтому для специализации нейрональных предшественников, полученных на первом этапе или извлеченных из заморозки, использовали высокие концентрации Shh и FGF8, 200нг/мл и 100нг/мл, соответственно. Shh в культуральной среде можно частично заменить низкомолекулярным веществом пурморфамином (Li, X.J., et al., 2008). В этом случае концентрацию рекомбинантного Shh в культуральной среде можно снизить до 100нг/мл, что представляется значительной экономией. По окончании данного этапа нейрональные предшественники меняются морфологически, можно видеть тело клетки и отросток, по длине не превышающий трех диаметров тела клетки (Рисунок 17 слева внизу). Такие нейрональные предшественники уже являются предшественниками нейронов среднего мозга и могут быть пересеяны раствором Версена и подвергнуты криоконсервации. Возможность сохранять в жидком азоте нейрональные предшественники на разных стадиях дифференцировки, позволяет создать банк таких дифференцированных производных. Для постановки эксперимента с взрослыми нейронами отсутствует необходимость каждый раз начинать дифференцировку со стадии ИПСК, что позволяет экономить дорогостоящие компоненты среды и такой важный ресурс, как время.

На последнем этапе дифференцировки клетки культивируют в присутствии факторов BDNF и GDNF, которые способствуют созреванию нейронов. Также в среде для культивирования присутствует форсколин, обеспечивающий селективное выживание постмитотических клеток и уменьшающий, таким образом, количество глиальных клеток (Hochbaum D. et al., 2011). Аскорбиновая кислота применяется в качестве антиоксиданта. На этом этапе нейроны пересеяны уже быть не могут. Морфологически большинство нейронов на этом этапе представляют собой клетки с маленькой сомой и одним, двумя или несколькими отростками (Рисунок 17, справа внизу).

Разработанный протокол нейрональной дифференцировки занимает 38 дней, после этого клетки могут поддерживаться в среде для созревания в присутствии BDNF, GDNF и

аскорбиновой кислоты еще как минимум 40 дней. На 38 день дифференцировки клетки анализировали различными молекулярно-биологическими методами. ПЦР - анализ показал, что полученные нейроны экспрессируют характерный для зрелых нейронов маркер – синаптофизин (Рисунок 18А), который локализуется в мембране синаптических пузырьков в пресинаптическом нейроне и участвует в механизме слияния синаптического пузырька с мембраной при выбросе нейромедиатора (Wiedenmann B., Franke W.W., 1985; Edelman L. et al., 1995; Sarnat S.B., 2013). БП развивается в зрелом и пожилом возрасте, и гибели подвергаются полностью зрелые постмитотические нейроны черной субстанции. Наличие экспрессии синаптофизина свидетельствует о присутствии в культуре зрелых нейронов, обладающих синапсами. Для изучения патогенеза БП наиболее интересно сравнить именно зрелые нейроны, имеющие мутацию, с нейронами не несущими ее, по их функциональным свойствам. Также, полученные нами культуры нейронов экспрессируют маркер катехоламинергических, в частности, дофаминергических нейронов тирозингидроксилазу (Рисунок 18А), которая катализирует превращение L-тирозина в L-ДОФА и лимитирует скорость всего процесса синтеза дофамина. В качестве общего нейронального маркера был выбран β -III-тубулин, который участвует в образовании цитоскелета нейронов, но не экспрессируется в глиальных клетках. По результатам иммуноцитохимического окрашивания в дифференцированной культуре на 38 день дифференцировки β -III-тубулин экспрессируется в нейрональных культурах на высоком уровне (Рисунок 18Б). Экспрессия тирозингидроксилазы также подтверждена на уровне белка (Рисунок 18Б). Для выявления экспрессии ТН на уровне мРНК (Рисунок 18А) применяли неколичественный метод ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количественную оценку эффективности дифференцировки проводили на 65 день дифференцировки с помощью проточной цитофлуориметрии (описано в разделе 3.5. Изучение эффективности дифференцировки нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с БП).



Б

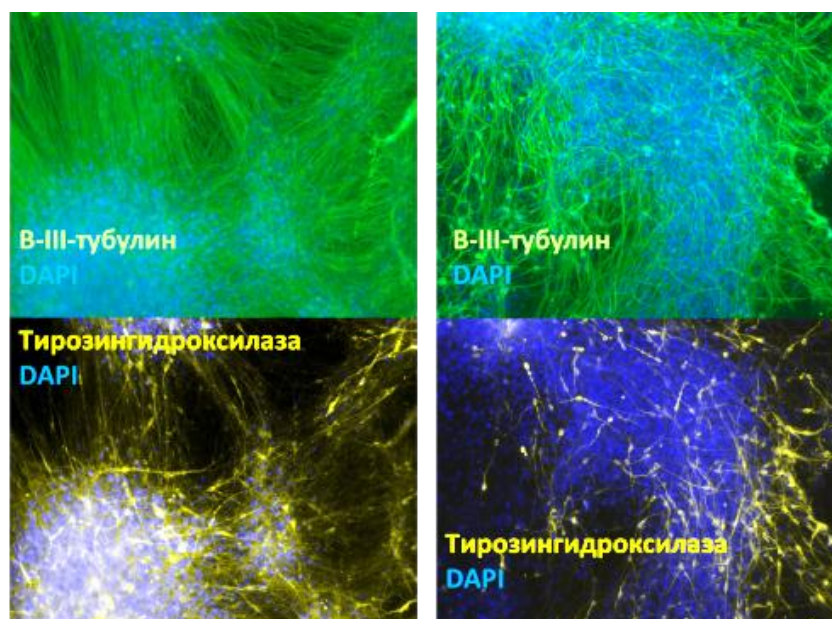


Рисунок 18. Анализ нейрональных культур на 38 день дифференцировки на экспрессию нейрональных маркеров и маркера зрелого состояния нейронов методами ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимии. А - ПЦР-анализ нейрональных культур, дифференцированных из линий ИПСК, полученных из материала пациентов с болезнью Паркинсона и от здорового донора. Показана экспрессия общего нейронального маркера и маркера дофаминергических нейронов на 34 и 54 дни дифференцировки. TH – тирозингидроксилаза, SYN – синаптофизин, GAPDH – глицеральдегид трфосфат дегидрогеназа. IPSRG2L, IPSRG6L – линии ИПСК от здорового донора; IPSPDL1.4L, IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L – линии ИПСК от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*; IPSPDP1.5L – линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*. Б – Иммуноцитохимически анализ нейрональных культур. Зеленый – β -III-тубулин, желтый – тирозингидроксилаза, синий – DAPI. Левый столбик – линия IPSPDL1.6L, несущая мутацию в гене *PARK8*, правый столбик – линия IPSRG2L, полученная от здорового донора. Увеличение 100X.

По сравнению с ранее опубликованным протоколом направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны (Kriks S. et al. 2011) примененный в работе протокол занимает на 4 дня больше времени (38 дней). Возможность хранить нейрональные предшественники позволяет создать банк предшественников от различных линий и использовать их по мере необходимости. Единичная дифференцировка $1-2 \times 10^6$ ИПСК позволяет получить 10×10^6 ранних нейрональных предшественников (после первого этапа дифференцировки) или 40×10^6 нейрональных предшественников, коммитированных в дофаминергические нейроны (после

второго этапа дифференцировки). Если для последующих экспериментов использовать выведенные из заморозки клетки-предшественники, то продолжительность дифференцировки сократится до 24 дней (при использовании предшественников после первого этапа дифференцировки) или до 14 дней (при использовании предшественников после второго этапа дифференцировки). Кроме того, наличие банка предшественников позволяет в большей степени стандартизировать эксперименты с взрослыми нейронами, т.к. материал для ряда экспериментов будет происходить из одной дифференцировки одной порции клеток исходной линии ИПСК.

3.5. Изучение эффективности дифференцировки нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с БП

Определение эффективности нейрональной дифференцировки необходимо для использования дифференцированных производных ИПСК в качестве модели для изучения БП. В зависимости от представленности целевого типа клеток в популяции следует подбирать адекватный способ обнаружения фенотипа исследуемого заболевания и детекции изменений при скрининге лекарственных препаратов. В большинстве работ, выполненных на ИПСК с мутациями, вызывающими БП, не проводили сравнения по эффективности дифференцировки в дофаминергические нейроны (Jiang H. et al., 2012; Cooper O. et al., 2012; Reinhardt P. et al., 2013; Su Y.-C. and Qi X., 2013). И лишь в одной работе наблюдали различия в эффективности дифференцировки в дофаминергические нейроны, однако эти различия не зависели от наличия или отсутствия мутации в исходной линии ИПСК и, как считают авторы, могли быть объяснены индивидуальными различиями линий ИПСК (Sanchez-Danes A. et al., 2012). Однако, при изучении ИПСК, полученных от БП с мутацией в гене LRRK2, при их дифференцировке в нейральные предшественники на поздних пассажах наблюдались различия. Нейрональные предшественники, несущие мутацию, после длительного пассирования утрачивали способность к дифференцировке в MAP2-положительные и β -III-тубулин-положительные нейроны, изменялась морфология ядра, в таких клетках не обнаруживались маркеры, свойственные клеткам черной субстанции (Liu G.-H. et al., 2012). Таким образом, не исключено, что при определенных условиях, возможно обнаружить патологический фенотип клеток на стадии дифференцировки.

Молекула клеточной адгезии, N-CAM (другое название CD56) локализуется на цитоплазматической мембране клетки, что упрощает процедуру иммуноцитохимического

окрашивания. Кроме того, N-CAM является наиболее удобным нейральным маркером, т.к. присутствует на нейрональных и глиальных клетках, но не экспрессируется на эпителиальных клетках (Goridis, C. et al., 1992). Эпителиальные клетки могут с небольшой вероятностью образовываться в наших условиях дифференцировки, т.к. ингибирование сигнальных путей Lefty/Activin/TGF β и BMP необходимо и для дифференцировки в эпителиальные производные, которые, как и нейроны, относятся к эктодермальному зародышевому листку. Примененный нами протокол дифференцировки позволяет получать культуру, практически свободную от клеток эпителиальной линии, поскольку выбранный нами маркер N-CAM позволяет отделить эпителиальные клетки от нейральных. ИПСК здорового донора и ИПСК пациентов с БП дифференцируются в нейральную линию с эффективностью около 90%, что подтверждается количественным подсчетом клеток, положительных на N-CAM, с помощью проточного цитофлуориметра. (Рисунок 19 сверху).

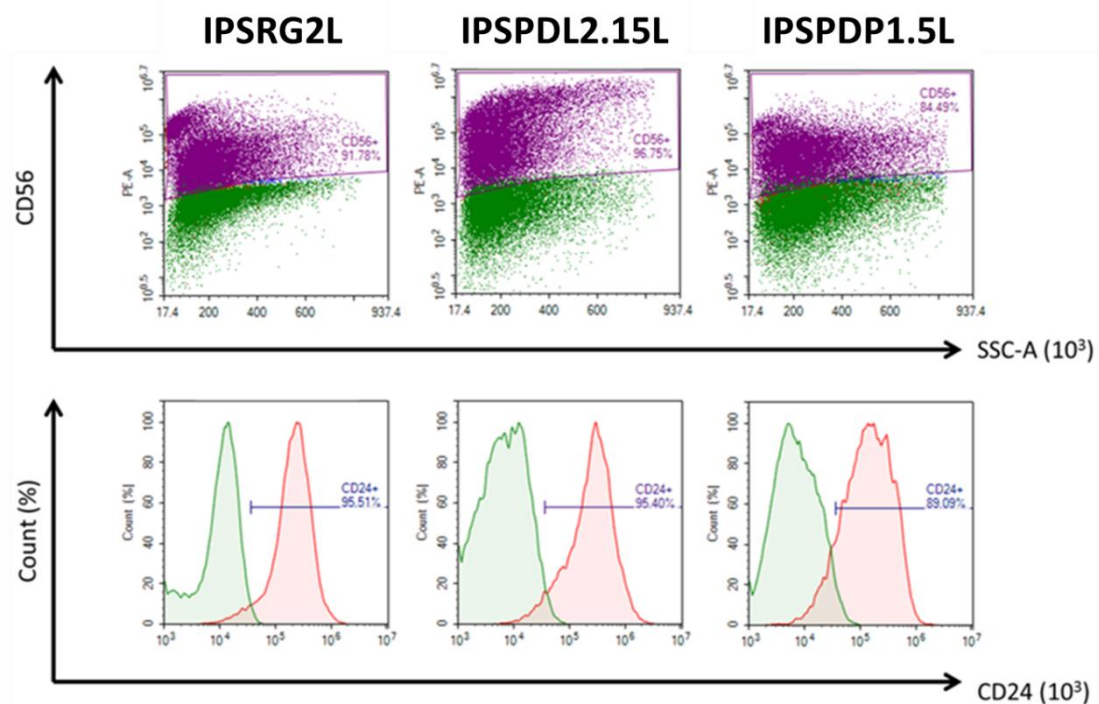


Рисунок 19. Результаты цитофлуориметрического анализа нейронов, дифференцированных из ИПСК, полученных из материала пациентов с БП и от здорового донора, на 65 день дифференцировки. Сверху - CD56 (N-CAM) – нейральная молекула клеточной адгезии, снизу – CD24 – молекула клеточной адгезии, IPSRG2L – линия ИПСК от здорового донора; IPSPDL2.15L - линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK8*, IPSPDP1.5L – линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*. Зеленый – контроль

окрашивания (изотип-контроль), фиолетовый – клетки, положительно окрашенные антителами против N-CAM, красный – клетки, положительно окрашенные антителами против CD24.

Мы оценивали эффективность нейрональной дифференцировки также и по наличию поверхностного маркера CD24 (Рисунок 19 внизу). Недавно было показано, что эта молекула клеточной адгезии экспрессируется на поверхности нейронов и нейрональных предшественников (Yuan S.H. et al., 2011). Использование поверхностного маркера значительно упрощает процедуру проточной цитофлуориметрии и позволяет работать с живыми клетками, что может быть необходимо для ряда экспериментов. Нам удалось получить популяцию клеток, на 90% состоящую из CD24-положительных клеток как при дифференцировке ИПСК здорового донора, так и при дифференцировке ИПСК с мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*.

Использованный нами протокол позволил получить нейрональные культуры в высокой степени обогащенные ТН – положительными клетками - до 90% (Рисунок 20). Достоверных различий в эффективности дифференцировки линий ИПСК, полученных интеграционным методом от здорового донора и от пациентов с БП, в дофаминергические (ТН-положительные) нейроны обнаружено не было. Среди исследованных линий ИПСК более низкая эффективность дифференцировки (около 70%) наблюдалась в линии, полученной от здорового донора, что подтверждает, что способность к дофаминергической дифференцировке является индивидуальной особенностью конкретной линии ИПСК.

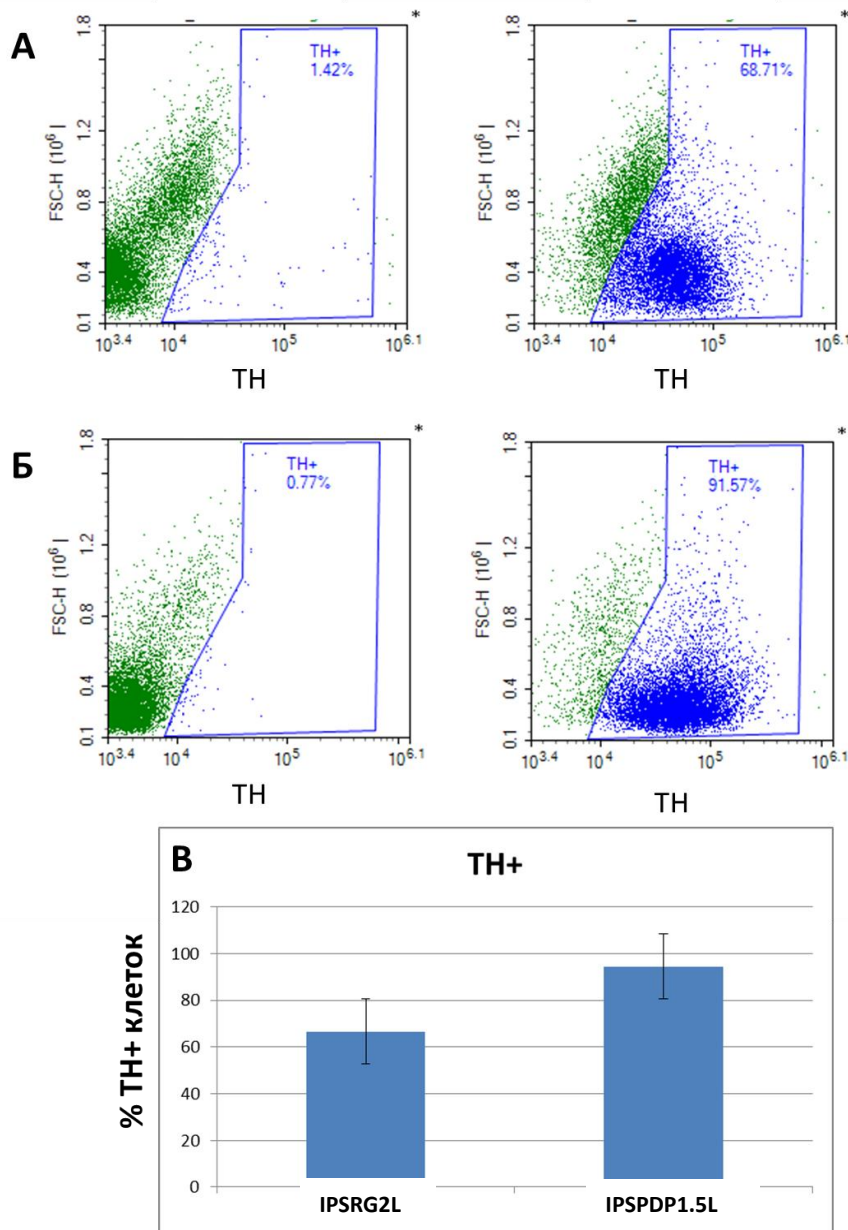


Рисунок 20. Цитофлуориметрический анализ нейронов, дифференцированных из ИПСК, полученных из материала пациентов с БП и от здорового донора, на 65 день дифференцировки. А, Б – Окраска на тирозингидроксилазу – ключевой фермент синтеза дофамина. А - клетки линии IPSRG2L (здоровый донор), слева – изотип-контроль, справа – окрашивание антителами против тирозингидроксилазы. Б – клетки линии IPSPDP1.5L (пациент с БП, вызванной мутацией в гене *PARK2*), слева – изотип-контроль, справа – окрашивание антителами против тирозингидроксилазы. В – результаты анализа нейрональных популяций на экспрессию TH с помощью проточной цитофлуориметрии, представленные в виде гистограммы.

Такая эффективность дифференцировки позволяет проводить эксперименты на популяции нейронов, не беспокоясь о вопросе достоверной детекции выживаемости или

смертности именно тирозингидроксилаза – положительных нейронов, что является обязательным условием при применении клеточных культур в качестве тест-систем для скрининга лекарственных препаратов. Достигнутая нами эффективность дифференцировки сопоставима с эффективностью дифференцировки, достигнутой Kriks S. и соавторами (Kriks S. et al., 2011). В настоящее время нам не известен более эффективный протокол направленной дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны, в котором не используется сортировка клеток или ведение в их геном каких-либо транскрипционных факторов.

В рассмотренных дифференцированных культурах ИПСК, полученных интеграционным методом, на 38 день дифференцировки присутствуют тирозингидроксилаза-положительные нейроны различной морфологии (Рисунок 21), с одним длинным отростком и с несколькими более короткими отростками. Возможно, что отсутствие морфологических различий между мутантными и здоровыми культурами связано с недостаточным временем культивирования (38 дней), по данным литературы различия между нормой и патологией наблюдаются после 75 дня дифференцировки (Sanchez-Danes A. et al., 2012).

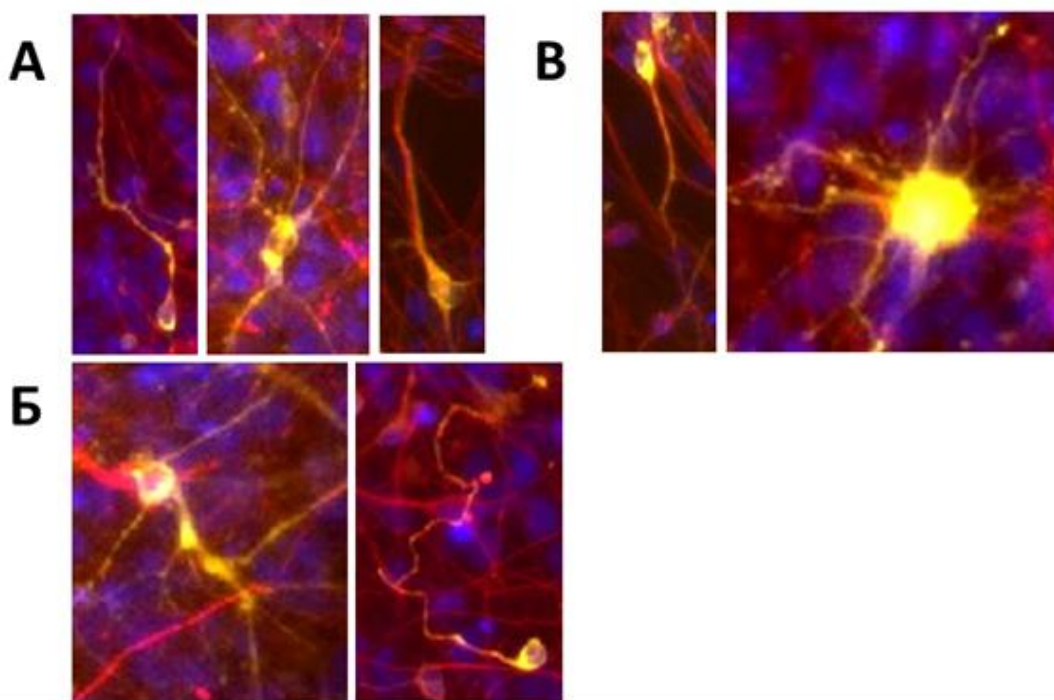


Рисунок 21. Окраска нейронов после 38 дней дифференцировки на β -III-тубулин (красный), тирозингидроксилазу (желтый) и DAPI (синий). На рисунке представлены микрофотографии дифференцированных производных ИПСК. А – IPSRG2L линия от здорового донора; Б – IPSPDL1.4L линия от пациента с мутацией в гене *PARK8*; В – IPSPDP1.5L линия от пациента с мутациями в обоих аллелях гена *PARK2*. Увеличение 200X.

Как в дифференцированных культурах от здоровых доноров, так и от пациентов с БП (мутация в гене *PARK8*) было показано наличие экспрессии киназы LRRK2 (Рисунок 22).

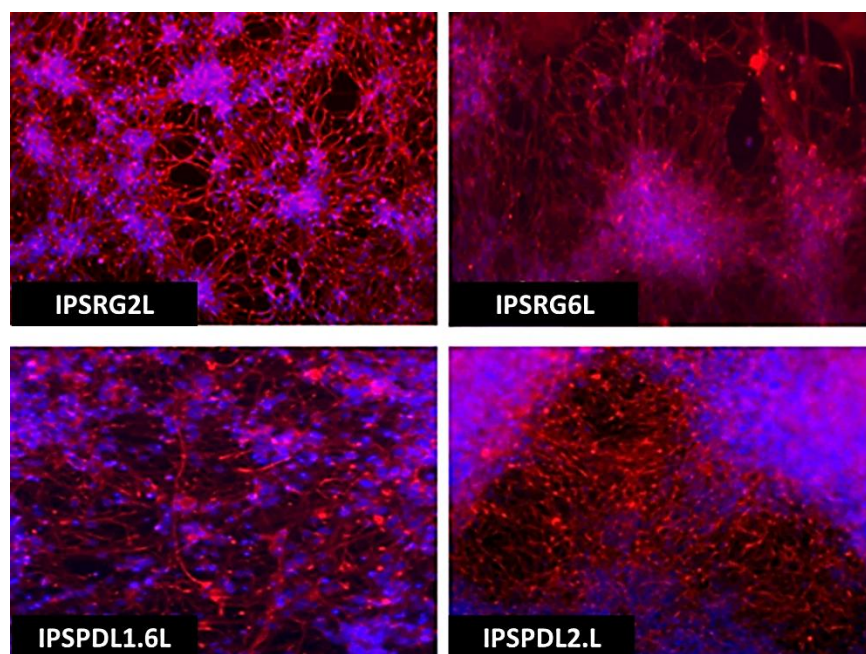


Рисунок 22. Иммуноцитохимическое окрашивание нейрональных культур (38 день дифференцировки) на LRRK2. IPSRG2L и IPSRG6L – линии от здорового донора; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L – линии от двух пациентов с мутацией в гене *PARK8*. LRRK2 – красный, DAPI – синий. Увеличение 100X.

Важным доказательством зрелости нейрональной популяции является отсутствие в ней пролиферации клеток. Только постмитотические нейроны могут являться зрелыми и функциональными. Для доказательства полноты созревания нейронов при применении описанного протокола был проведен анализ фазы клеточного цикла в популяциях нейронов на 65 день дифференцировки с помощью проточного цитофлуориметра. Подавляющее большинство клеток (до 90%) в обеих исследованных линиях – IPSRG2L (получена из материала здорового донора) и IPSPDP1.5L (получена из материала пациента с мутацией в гене *PARK2*) – находится в G1 фазе (Рисунок 23), т.е. не делятся, что позволяет сделать вывод о том, что на данном этапе дифференцировки клетки являются зрелыми постмитотическими нейронами.

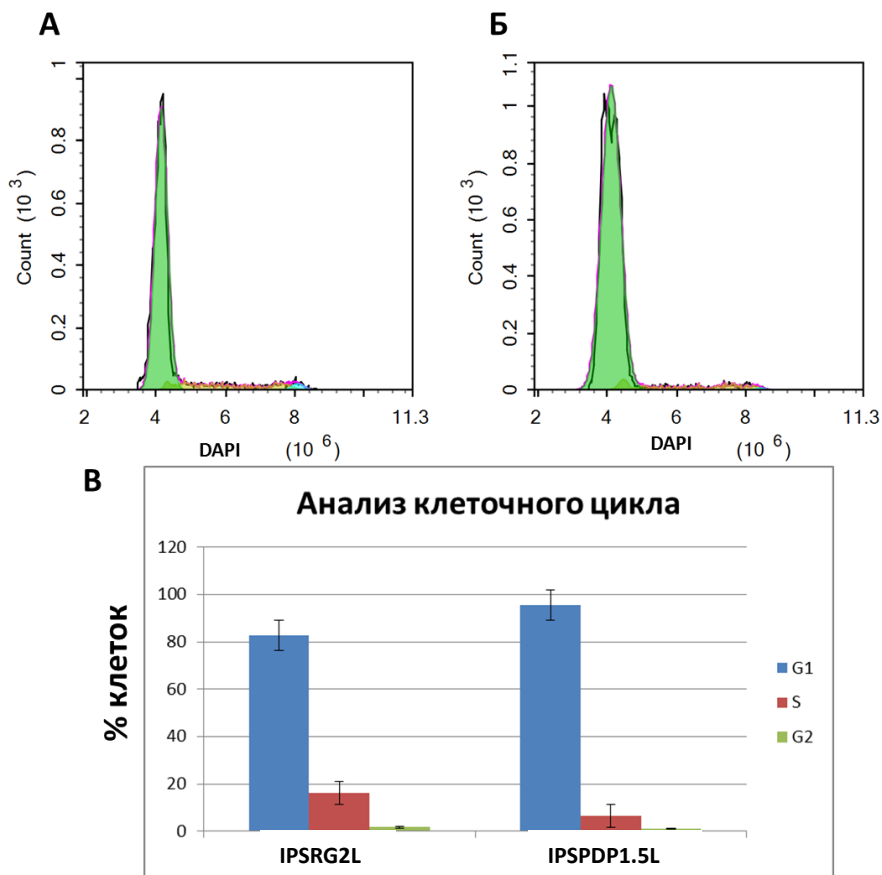


Рисунок 23. Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии. А – график распределения клеток по фазам клеточного цикла для клеток линии IPSRG2L, полученной от здорового донора. Б – график распределения клеток по фазам клеточного цикла для клеток линии IPSPDP1.5L, полученной от пациента с мутацией в гене *PARK2*. В – график отражает долю клеток находящихся в G1, S и G2 фазах клеточного цикла.

Для доказательства функциональной активности получаемых нейрональных культур оценивали способность нейронов к спонтанному выбросу дофамина. На 34 день дифференцировки среду культивирования заменяли буферным раствором (см. раздел Материалы и методы) и инкубировали 30 минут, затем собирали кондиционированный буферный раствор и измеряли в нем содержание дофамина с помощью ион-парной обращеннофазовой хроматографии с амперометрической детекцией. Было показано, что все изученные линии клеток способны к спонтанному выбросу нейромедиатора (Таблица 4). Требуется дополнительные эксперименты для набора статистических данных по этому параметру, однако, функциональная активность (способность к синтезу дофамина) нейрональных популяций, дифференцированных из линий ИПСК с пациентов с БП и линий ИПСК, не имеющих мутаций, не вызывает сомнений.

Таблица 4. Уровень спонтанного выброса дофамина TH+ - нейронами, дифференцированными из линий ИПСК пациентов с БП и линий ИПСК здорового донора.

Линия клеток	Дофамин (пикомоль/10 ⁶ TH+ клеток)
IPSPG2L (здоровый донор)	6,99
IPSRG4S (здоровый донор)	73,4
IPSPDL1.6S (мутация в гене <i>PARK8</i>)	111,76
	18,4
	24,3
IPSPDL2.15L (мутация в гене <i>PARK8</i>)	48,37
	74,05
IPSPDP1.5L (мутация в гене <i>PARK2</i>)	14,05
	130,07

Наличие в дифференцированных нейронах экспрессии белка LRRK2 делает возможным использование полученных нами культур зрелых нейронов, обогащенных TH – положительными клетками, для изучения механизмов развития БП, вызванной мутацией в гене *PARK8*, *in vitro* и для скрининга потенциальных лекарственных средств. Наличие экспрессии общих нейрональных маркеров (β -III-тубулин и синаптофизин) и маркера дофаминергических нейронов – тирозингидроксилазы, а также электрофизиологическая активность (Лебедева О.С. et al., 2013) и способность к выработке дофамина получаемых постмитотических нейронов свидетельствуют о том, что нами разработан эффективный способ получения клеточной популяции для дальнейших исследований механизмов патогенеза БП.

3.6. Изучение дифференциальной экспрессии генов в нейрональных производных ИПСК, полученных от пациентов с БП и здорового донора

Мутации в генах *PARK8* и *PARK2* являются наиболее распространенными среди пациентов, страдающих от наследственных форм БП. Показано, что киназа LRRK2 и E3-убиквитин лигаза паркин являются участниками одного каскада реакций, ответственного за поддержание нормального функционирования митохондрий в клетке. (Smith W.W., et al., 2005). Кроме участия в этом каскаде оба белка имеют и других партнеров по взаимодействию (в качестве примеров Kumar A. and Cookson M.R., 2011 и Yang F. et al., 2005). Доподлинно функции и мишени LRRK2 и паркина еще не определены. Возможно, какие-либо из путей их

взаимодействий приводят к изменению в паттерне экспрессии генов в нейронах. Определение различий в транскриптомах мутантных и здоровых нейронов может указать новые пути в изучении патогенеза БП, вызванной мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*. Также полногеномный транскриптомный анализ может выявить ранее неизвестных потенциальных партнеров по взаимодействию для LRRK2 и паркина.

Для полногеномного транскриптомного анализа были выбраны шесть дифференцированных линий ИПСК, полученных интеграционным методом, кроме линии IPSRG10S, которая получена неинтеграционным методом, на трех сроках дифференцировки. Анализу подвергли три линии от здорового донора – IPSRG2Li IPSRG6L, каждая на 34 и 54 дни дифференцировки, и IPSRG10S на 75 день дифференцировки; по одной линии от двух пациентов с мутацией в гене *PARK8* - IPSPDL1.6L на 34 и 54 дни дифференцировки и IPSPDL2.15L на 54 и 75 дни дифференцировки; одна линия от пациента с мутацией в гене *PARK2* – IPSPDP1.5L на 34 и 54 дни дифференцировки.

Первоначально данные, полученные для каждой линии, были подвергнуты биоинформационному кластерному анализу по методу Эвклидовых расстояний (Рисунок 24). Было показано, что значительное влияние на полногеномный транскрипционный паттерн нейрональных культур оказывает срок дифференцировки. Дальнейший анализ проводили, сравнивая между собой данные, полученные на одном сроке дифференцировки нейронов на культурах здорового донора и пациентов с БП (в анализируемую группу помещали либо данные от всех пациентов с БП, либо разделяли по имеющимся мутациям). Кроме этого, отдельно анализировали данные по линиям, полученным от здорового донора, на разных сроках дифференцировки с целью изучить процессы взросления и старения нейрональных культур *in vitro*.

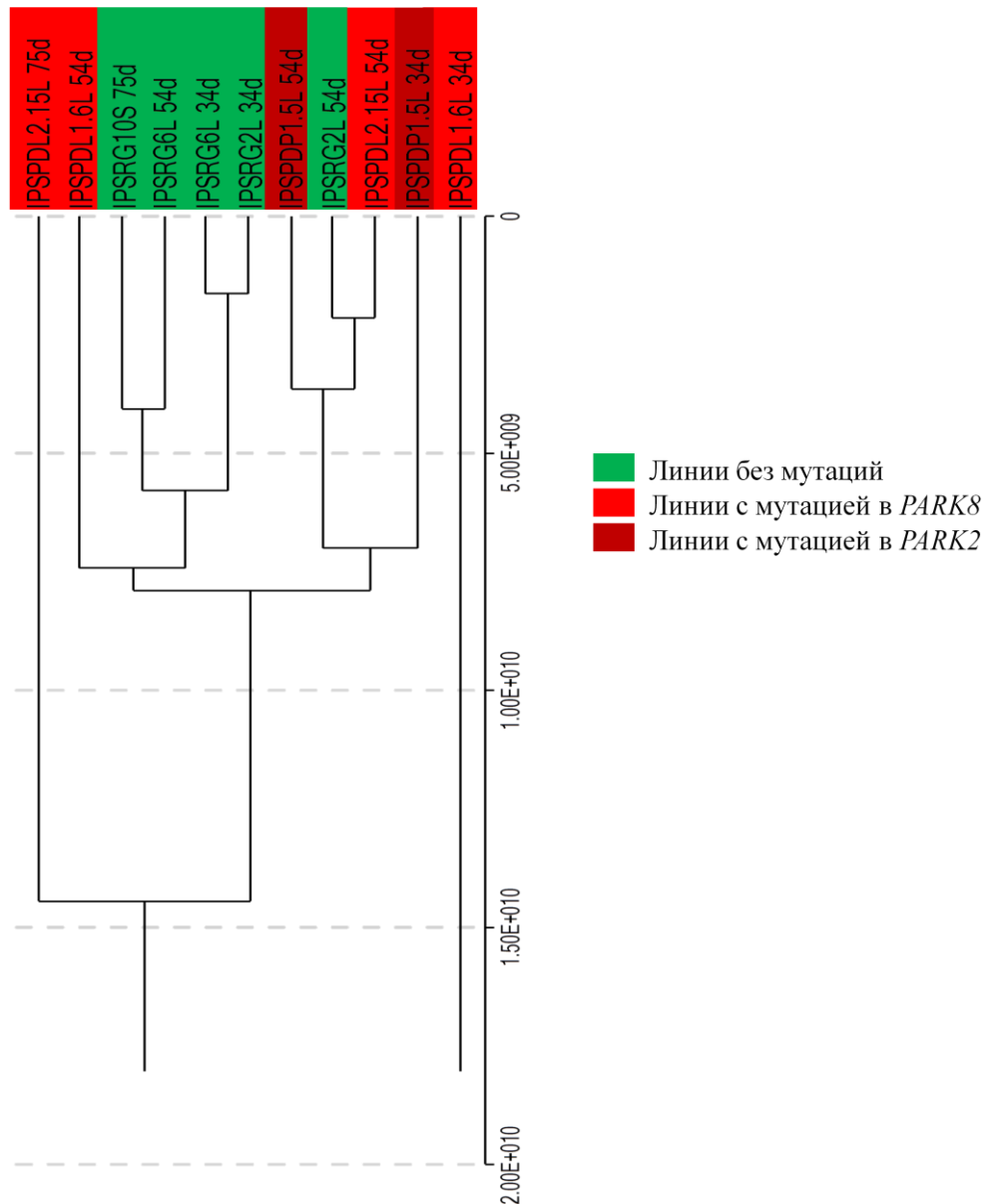


Рисунок 24. Кластерный анализ по методу Эвклидовых расстояний. IPSRG2L, IPSRG6L – линии ИПСК от здорового донора, полученные интеграционным методом; IPSRG10S - линия ИПСК от здорового донора, полученная неинтеграционным методом; IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L – линии ИПСК от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, полученные интеграционным методом; IPSPDP1.5L – линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, полученная интеграционным методом.

В программе GenomeStudio сравнивали между собой списки генов, полученные при транскриптомном анализе следующих линий ИПСК: здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 34 день дифференцировки и здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 54 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 34 день дифференцировки и здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 75 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 34 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от

пациентов с БП (IPSPDL1.6L, IPSPDP1.5L), на 34 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 34 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациента с БП с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL1.6L), на 34 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 34 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациента с БП с мутацией в гене *PARK2* (IPSPDP1.5L), на 34 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 54 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с БП (IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L, IPSPDP1.5L), на 54 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 54 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с БП с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L), на 54 день дифференцировки; здоровые (IPSRG2L и IPSRG6L) нейроны на 54 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с БП с мутацией в гене *PARK2* (IPSPDP1.5L), нейроны на 54 день дифференцировки; здоровые (IPSRG10S) нейроны на 75 день дифференцировки и нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с БП с мутацией в гене *PARK8* (IPSPDL2.15L) нейроны на 75 день дифференцировки. Число дифференциально экспрессированных генов, обнаруженных в каждом сравнении, представлено в таблице 5.

Таблица 5. Число дифференциально экспрессированных генов, обнаруженных при сравнении полногеномных транскриптомных данных от нейронов, дифференцированных из мутантных и немутантных линий ИПСК.

Контрольная группа	Сравниваемая группа	Количество дифференциально экспрессированных генов	Количество генов, экспрессия которых повышена в контрольной группе	Количество генов, экспрессия которых повышена в сравниваемой группе
Норма 34д	Норма 54д	481	319	162
Норма 34д	Норма 75д	3516	1324	2192
Норма 34д	БП независимо от мутации 34д	87	75	12
Норма 34д	Мутация <i>PARK8</i> 34д	1836	1022	814
Норма 34д	Мутация <i>PARK2</i> 34д	1510	696	814
Норма 54д	БП независимо от мутации 54д	21	19	3
Норма 54д	Мутация <i>PARK2</i> 54д	130	102	28
Норма 54д	Мутация <i>PARK2</i> 54д	1083	240	843

При сравнении нейронов, полученных из ИПСК здорового донора, на разных сроках дифференцировки было обнаружено, что на 34 день дифференцировки в культурах нейронов повышена экспрессия генов, участвующих в клеточном цикле и митозе, по сравнению с культурами на 54 и 75 дни дифференцировки (Приложение 1). В культурах на 54 день дифференцировки повышена экспрессия генов, ответственных за синаптическую пластичность, передачу нервного импульса, рост нейритов (Приложение 2). Мы предполагаем, что на 34 день дифференцировки в культуре все еще присутствуют не полностью зрелые нейрональные предшественники, способные к делению. На 54 день дифференцировки культура состоит из полностью зрелых нейронов, и предшественники, которые сохранялись в культуре на 34 день дифференцировки, прошли процесс созревания до постмитотических взрослых нейронов. В культурах на 75 день дифференцировки повышается экспрессия генов, участвующих в работе лизосом и фагосом (Приложение 3), что свидетельствует о том, что в нейронах на таком позднем сроке культивирования начинаются процессы деградации и апоптоза.

При сравнении здоровых нейронов и нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с БП (в группу сравнения объединены данные по всем пациентам, не зависимо от того, какую мутацию они имели), на 34 день дифференцировки были обнаружены достоверные различия в экспрессии 87 генов (Приложение 4). В данном эксперименте наиболее сильное отличие по экспрессии показал ген глутатион трансферазы (GSTT1), который был повышено экспрессирован в клетках, несущих мутации (разница по экспрессии в 161 раз). Такой интересный результат, скорее всего, является следствием того, что экспрессия глутатион трансфераз крайне индивидуальна, а в случае клеточных культур в значительной степени зависит от условий культивирования. Исходя из выше сказанного, несмотря на достоверные различия по экспрессии глутатион трансфераз в нейронах с мутациями и в немутантных нейронах, эти ферменты не играют роли в патогенезе БП. Наш вывод подтверждается и данными литературы. На протяжении последних 20 лет проводили различные исследования с целью выяснить наличие связи между глутатион трансферазами и БП, поскольку эти ферменты являются весьма привлекательными кандидатами. Они участвуют в утилизации продуктов перекисного окисления липидов, образующихся в клетке при окислительном стрессе, который, в свою очередь является одной из причин гибели дофаминергических нейронов при БП. Однако убедительной связи уровня экспрессии глутатион трансфераз с развитием БП обнаружено не было (Wang T. et al., 2014; Cornetta T. et al., 2013).

При сравнении здоровых нейронов и нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с мутацией в гене *PARK8*, на 34 день дифференцировки, было показано, что в мутантных клетках повышено экспрессируются гены, ответственные за развитие нейронов и синтез нейромедиаторов, тогда как в контрольных здоровых клетках повышена экспрессия генов,

продукты которых участвуют в клеточном цикле и делении клетки (Приложение 5). В тех же нейронах на 54 день дифференцировки достоверно повышается экспрессия генов, связанных с функционированием фагосом и лизосом (Приложение 6), по сравнению с немутантными нейронами на том же сроке дифференцировки. Эти данные говорят о том, что у мутантных нейронов, вероятно, созревание происходит быстрее и гибель нейронов начинается раньше, чем у не мутантных нейронов. Кроме того, данные литературы свидетельствуют о том, что LRRK2 участвует в регулировании аутофагии (Tong Y. et al., 2012).

При сравнении здоровых нейронов и нейронов, полученных из ИПСК от пациента с мутацией в гене *PARK2*, на 34 день дифференцировки, было показано, изменение экспрессии генов принадлежащих к различным кластерам (Приложение 7). В виду того, что паркин участвует в поддержании гомеостаза митохондрий в клетке, нам показалось особенно интересным, что в мутантных клетках повышается экспрессия 65 генов, участвующих в функционировании митохондрии (Приложение 8). Повышено экспрессированные гены отвечают за нормальную работу митохондрии: ферменты цикла Кребса, некоторые тРНК-синтазы, ферменты метаболизма жирных кислот. Мы предполагаем, что таким образом мутантная клетка компенсирует дефицит полноценно функционирующих митохондрий. Одной из основных функций E3-убиквитин лигазы паркина является убиквитинилирование белков внешней мембраны митохондрий, утративших потенциал, такие митохондрии не способны осуществлять окислительное фосфорилирование и электроны из дыхательной цепи сбрасываются на кислород с образованием губительных для клетки активных форм кислорода. Маркированные убиквитином митохондрии захватываются аутофагосомами и перевариваются в процессе митофагии. При дефекте паркина дефектные митохондрии не подвергаются митофагии, накапливаются в клетке, вызывают окислительный стресс, что приводит к апоптозу (Kitada T. et al., 1998; Shimura H. et al., 2000; Whitworth A.J., Pallanck L.J., 2009; Youle R.J., Narendra D.P., 2011). В мутантной клетке одновременно присутствуют митохондрии, лишённые потенциала, и нормально функционирующие митохондрии, а процесс утилизации поврежденных митохондрий нарушен (Imazumi Y. et al., 2012). Вероятно, общее количество митохондрий возрастает, и для обеспечения их потребности в необходимых для работы белках увеличивается продукция мРНК этих белков.

При сравнении здоровых нейронов и нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с БП (в группу сравнения объединены данные по всем пациентам, не зависимо от того, какую мутацию они имели), на 54 день дифференцировки, были обнаружены различия в экспрессии 21 гена (Приложение 9). Сведений о связи этих генов с болезнью Паркинсона в литературе нами обнаружено не было. Вероятно, мутации в генах *PARK2* и *PARK8* вызывают различные изменения в экспрессии генов, и при объединении данных от этих пациентов для сравнения со

здоровым донором различия в транскриптом не могут быть выявлены с помощью применяемого математического аппарата.

При сравнении на 54 день дифференцировки популяций клеток от здорового донора и пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, было обнаружено, что в мутантных клетках активно идет клеточное деление и метаболизм осуществляется за счет гликолиза (Приложение 10), что не характерно для постмитотических нейронов. У пациента повышена в 2 раза экспрессия таких генов гликолитического пути, как глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (*GAPDH*), енолаза 2 (*ENO2*), триозофосфатизомераза (*TPI1*), глюкозо-6-фосфат изомераза (*GPI*), фосфоглицератмутаза (*PGAM1*), альдолаза (*ALDOA*, *ALDOC*), гексокиназа (*HK2*). Гликолиз активно используют делящиеся и дифференцирующиеся клетки, т.к. этот путь позволяет как получать энергию в виде АТФ, так и строительный материал для анаболических процессов в клетке. Постмитотические нейроны преимущественно получают АТФ с помощью более эффективного процесса окислительного фосфорилирования (Gusdon A.M., Chu C.T., 2011). Повышение экспрессии генов ферментов гликолитического пути при БП не описано в известной нам литературе. Вероятно, активация гликолитического пути происходит из-за накопления в мутантных клетках поврежденных митохондрий, которые не могут в достаточной степени осуществлять окислительное фосфорилирование. Возможно изменения в экспрессии генов являются следствием неправильной утилизации циклинов D и E, которые являются субстратами паркина (Gong Y. et al., 2014), в результате чего в клетках пациента изменяется паттерн экспрессии генов, связанных с делением клетки.

При изучении транскриптомных данных, полученных при анализе образцов крови пациентов с диагнозом «БП», но еще не начавших проходить лечение, и здоровых доноров были выявлены дифференциально экспрессированные гены, относящиеся к таким кластерам, как лизосома и внутриклеточный транспорт, что согласуется с результатами настоящего исследования (Alieva A.Kh. et al., 2014). Однако в описываемой работе были также выявлены различия в экспрессии генов, относящихся к кластерам иммунный ответ, альтернативный сплайсинг, регуляция каталитической активности и другие. Различия с представленным в настоящей работе паттерном экспрессии генов можно объяснить тем, что в работе Alieva A.Kh. et al. анализ был проведен на материале пациентов со спорадической формой БП и анализируемый тип клеток координально отличался от исследуемого в настоящей диссертации.

При анализе постмортальных образцов черной субстанции головного мозга пациентов с БП различной этиологии на полногеномном транскриптомном уровне были выявлены изменения в экспрессии генов по сравнению со здоровыми донорами. Дифференциально экспрессированные гены относились, в том числе и к таким кластерам, как нейрональная дифференцировка, митохондрия и лизосома (Glaab E., Schneider R., 2015), которые были

выявлены и в приведенном транскриптомном анализе. Белки, повреждаемые вследствие описанных мутаций, хотя и являются частью одного сигнального каскада, но функционируют на разных его уровнях. Киназа с не полностью известной функцией LRRK2, имеет множество других партнеров по взаимодействию, кроме тех, которые участвуют в привлечении паркина к поврежденной митохондрии. Транскриптомный анализ показал очевидные различия в паттерне экспрессии генов в нейронах с разными мутациями. Дальнейшее изучение данной модели позволит более полно раскрыть механизмы патогенеза БП, вызванной мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*.

Заключение

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и БП, являются хроническими прогрессирующими заболеваниями и приводят к смерти пациента. Существующая терапия нейродегенеративных заболеваний носит симптоматический и паллиативный характер и направлена на устранение симптомов заболевания, а на поздних стадиях на уменьшение страданий пациента. Методов лечения, способных остановить развитие болезни или излечить пациента, не существует. Положение осложняется отсутствием адекватных модельных объектов для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний и скрининга новых лекарственных препаратов. Разработка модельных систем для изучения нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БП, является перспективной и актуальной задачей.

К моменту начала диссертационной работы в 2009 году методы получения и работы с ИПСК человека были достаточно хорошо разработаны, несмотря на то, что первые линии ИПСК человека были получены лишь в 2007 году (Takahashi K. et al., 2007; Yu J. et al., 2007). Однако протоколы направленной дифференцировки ИПСК в целевой тип клеток требуют проверки и оптимизации в условиях конкретной лаборатории, что является трудоемким и длительным процессом (примененный в настоящей работе протокол дифференцировки в ТН-положительные нейроны занимает 38 дней). Эффективность большинства существующих протоколов направленной дифференцировки по-прежнему невысока. Клеточные модели БП, основанные на зрелых нейронах, будут интересны и высокоинформативны лишь в случае получения популяции нейронов, в значительной степени обогащенной целевым типом клеток (ТН-положительными нейронами). Такие культуры могут быть применены для полногеномных исследований, а также они значительно упрощают и электрофизиологические, протеомные и фармакологические исследования.

В ходе выполнения диссертационного исследования был создан и охарактеризован первый в России набор ИПСК пациентов с наследственными формами БП. В коллекции мутантных линий присутствуют линии от двух пациентов с аутосомно-доминантной мутацией G2019S в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, и от одного пациента, который является компаунд-гетерозиготным носителем аутосомно-рецессивных мутаций в гене *PARK2*, кодирующем Е3-убиквитинлигазу паркин. Примененный в работе протокол репрограммирования позволяет получать ИПСК и из материала пациентов с другими нейродегенеративными заболеваниями (Некрасов Е.Д. с сотр., 2011). ИПСК из фибробластов кожи пациентов были получены двумя

методами – интеграционным и неинтеграционным. Впервые методом полногеномного анализа метилирования ДНК было показано отсутствие достоверных различий в метилирования ДНК недифференцированных ИПСК, полученных из материала одного пациента различными методами, т.е. линии ИПСК могут быть применены для моделирования наследственных заболеваний независимо от того, каким методом они получены. В диссертационном исследовании была продемонстрирована способность ИПСК, несущих мутации, связанные с развитием БП, дифференцироваться в ТН-положительные нейроны независимо от наличия мутации. Эффективность дифференцировки достигает 70-90%, что позволяет использовать такие обогащенные популяции в исследованиях, осуществляемых с помощью различных технологий и методов, в том числе и для полногеномных анализов, без необходимости дополнительной очистки популяции от примесных типов клеток. При разработке протокола направленной дифференцировки в него были внесены два этапа пересева нейрональных предшественников, при этом нейрональные предшественники могут быть заморожены, что позволяет сохранять такие клетки в большом количестве и уменьшать затраты времени и дорогостоящих реактивов.

В ходе диссертационного исследования был проведен полногеномный транскриптомный анализ нейрональных популяций, обогащенных ТН- положительными нейронами, который выявил ряд различий между мутантными и немутантными клетками. Наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными генами при БП являются метаболические пути, связанные с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом. Этот первый эксперимент с применением разработанной модели показывает возможность её использования в исследовании патогенеза заболевания, например при изучении функционирования митохондрий при развитии БП, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов.

Выводы

1. Наличие генетических мутаций, ассоциированных с болезнью Паркинсона (G2019S в гене *PARK8*; IVS1+1G/A и делеция 202-203 (AG) в гене *PARK2*), не влияет на эффективность и качество генетического репрограммирования пациент-специфических дермальных фибробластов.
2. Впервые показано, что использование интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования не приводит к статистически значимому изменению паттерна метилирования ДНК на полногеномном уровне, а также не влияет на эффективность репрограммирования пациент-специфических дермальных фибробластов.
3. Разработанный оригинальный протокол направленной дифференцировки ИПСК позволяет воспроизводимо получать популяцию постмитотических нейронов, содержащую до 80% дофаминергических нейронов.
4. Впервые показано, что на уровне транскриптома в дофаминергических нейронах, дифференцированных из мутантных ИПСК, наблюдаются нарушения, связанные с функциями мутированных генов (*PARK8* и *PARK2*). Таким образом, созданы генетические системы для изучения БП *in vitro*.
5. Создан банк ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с семейной формой БП (мутации в генах *PARK8* и *PARK2*) и из фибробластов здоровых доноров интеграционным и неинтеграционным методами.

Список использованных сокращений

АТФ - аденозинтрифосфат

БП – болезнь Паркинсона

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внутренняя клеточная масса

ГАФД (GAPDH) – глицеральдегид трифосфат дегидрогеназа

ГТФ – гуанидинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПСК – плюрипотентные стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

ЦНС – центральная нервная система

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

BDNF – brain derived neurotrophic factor

bFGF – basic Fibroblast growth factor (основной фактор роста фибробластов)

CCCP – Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид

DNMTs – DNA methyl transferase (ДНК метилтрансфераза)

FBS – Fetal bovine serum (Эмбриональная сыворотка коровы)

FGF8 – Fibroblast growth factor 8 (фактор роста фибробластов 8)

FITC – Fluorescein isothiocyanate

GDNF – glial cell line derived neurotrophic factor

ICF – Immunodeficiency, Centromeric instability and Fascial abnormalities (Иммунодефицит, центромерная нестабильность и лицевые аномалии)

LRRK – leucine rich repeat kinase

MMLV – mouse Moloney leukemia virus

MPTP – 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

N-CAM – neuronal-cell adhesion molecule

PFA – paraformaldehyde

SCNT – somatic cell nuclei transfer (перенос ядра соматической клетки)

Shh – Sonic hedgehog

TH - тирозингидроксилаза

VPA – valproic acid

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих перечню ВАК:

1. **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2011. - Т. 5. - №4. - С. 37-45.
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. VI. - №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., 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. **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. // Нейрохимия. – 2013. – Т. 3. – С. 233-241. (Английская версия: Lebedeva O.S., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Mukhina I.V., Vedunova M.V., Usova O.V., Stavrovskaya A. V., Yamshchikova N.G., Fedotova E.Yu., Grivennikov I.A., Khaspekov L.G., Illarioshkin S.N. The morphofunctional properties of induced pluripotent stem cells derived from human skin fibroblasts and differentiated to dopaminergic neurons. // Neurochem. J. – 2013. – Vol. 7. - P. 207-214).
5. Иллариошкин С.Н., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А., **Лебедева О.С.** Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в неврологии. // Современные мед. Технологии. – 2013. - №10. - С. 55-59.
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. 466-478.

7. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., **Lebedeva O.S.**, Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Yu., Illarioshkin S.N., Kaznacheyeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // Mol. Neurodegener. - 2016. - V. 11. - № 1. - P. 27-42.

Публикации в других изданиях:

1. **Лебедева О.С.**, Гривенников И.А., Лагарькова М.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: получение и перспективы. // Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Ткачука. – Москва. - МАКС Пресс. - 2011.
2. **Лебедева О.С.**, Сюсина М.А., Иллариошкин С.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А. Перспективы и проблемы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в исследовании нейродегенеративных заболеваний. // Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Ткачука. – Москва. - МАКС Пресс. - 2012.
3. Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Grivennikov I.A., **Lebedeva O.S.**, Klyushnikov S.A., Chestkov I.V., Fedotova E.Yu., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N. A platform for studies of Huntington's disease and other neurodegenerative disorders on the basis of induced pluripotent stem cells. // J. Huntington's Dis. 2013; 2 (abstracts of WCHD 2013): p. 16-17.
4. **Лебедева О.С.**, Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Получение и характеристика клеточной модели болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. // Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Ткачука. – Москва. - МАКС Пресс. - 2014.
5. Holmqvist S., Lehtonen S., Chumarina M., Puttonen K.A., Azevedo C., **Lebedeva O.**, Ruponen M., Oksanen M., Djelloul M., Collin A., Goldwurm S., Meyer M., Lagarkova M., Kiselev S., Koistinaho J., Roybon L. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. // npj Parkinson's disease. – 2016. – V. 2. – online.

Тезисы докладов и материалы конференций (избранное):

1. **Лебедева О.С.**, Честков И.В., Некрасов Е.Д., Сюсина М.А., Васина Е.М., Иллариошкин С.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона). // VIII Международная конференция “Молекулярная генетика соматических клеток” - Звенигород, Россия; 2011, С. 54.
2. **Lebedeva O. S.**, Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Nekrasov E.D., Susina M.A., Chestkov I.V., Vassina E.M., Illarioshkin S.N., Grivennikov I.A. Establishment of iPSC lines from Parkinson’s diseased patients for molecular mechanisms study. // ISSCR 10th Annual meeting, Yokohama, Japan; 2012 V. 1, p. 22.
3. 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. // ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan; 2012.
4. Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Некрасов Е.Д., **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А. Перспективы и проблемы применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в неврологии. // Тезисы доклада на III конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» - Москва, Россия; 2011, с. 36-37.
5. Гривенников И.А., Антонов С.А., Арсеньева Е.Л., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Кобылянский А.Г., Лагарькова М.А., **Лебедева О.С.**, Мануилова Е.С., Новосадова Е.В. Клеточные технологии для поиска и изучения механизмов действия новых лекарственных препаратов. // Тезисы доклада на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» - Петрозаводск, Россия; 2011, с. 97.
6. И.А. Гривенников, Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, В.В. Симонова, С.Н. Иллариошкин, О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова, В.З. Тарантул. «Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новая веха в развитии нейрофармакологии и нейробиологии». // Тезисы доклада на 6-й Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Россия, Московская область, п. Клязьма, 09-13 ноября 2015 г.

7. **Lebedeva O. S.**, Vassina E.M., Nekrasov E.D., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Illarioshkin S.N., Kiselev S.L., Grivennikov I.A., Lagarkova M.A. Development of Parkinson's disease cell model based on diseased iPS cells – derived mature neurons. // Stem cell models of Neuronal regeneration and disease – Dresden, Germany, 2016. – P.75.
8. Lehtonen S., Puttonen K., Koskivi M., Kocianova R., **Lebedeva O. S.**, Oksanen M., Gao Y., Maderycova Z., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Koistinaho J. Characterization of LRRK2 mutant iPS-derived dopaminergic neurons and astrocytes. // Stem cell models of Neuronal regeneration and disease – Dresden, Germany, 2016. – P.71.

Патенты:

Патент №2458983. Приоритет от 18.07.2011. Зарегистрирован 20.08.2012. «Способ получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов пациентов с болезнью Хантингтона» / Гривенников И.А., **Лебедева О.С.**, Новосадова Е.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Ключников С.А.

Благодарности

Выражаю благодарность своим научным руководителям Марии Андреевне Лагарьковой и Игорю Анатольевичу Гривенникову за наставничество в работе и научное руководство, а также Сергею Львовичу Киселеву за помощь в моей работе над диссертацией.

Благодарю весь коллектив лаборатории молекулярной генетики соматической клетки за помощь и поддержку, особая благодарность Новосадовой Екатерине Вячеславовне, Мануиловой Екатерине Семеновне, Долотову Олегу Валентиновичу, Иноземцевой Людмиле Сергеевне, Антонову Станиславу Анатольевичу, Маркову Дмитрию Дмитриевичу, Арсеньевой Елене Львовне, Тарантулу Вячеславу Залмановичу.

Благодарю весь коллектив отдела эпигенетики ИОГен РАН за поддержку и участие в работе, особая благодарность Васиной Екатерине Михайловне, Богомазовой Александре Никитичне, Некрасову Евгению Дмитриевичу, Шутовой Марии Владимировне, Майоровой Ксении Сергеевне и Честкову Илье Валерьевичу.

Выражаю благодарность Сергею Николаевичу Иллариошкину, Катье Путтонен, Марике Руппонен, Риитте Кауппинен и Яри Коистинахо за участие в работе.

Выражаю свою признательность Сломинскому Петру Андреевичу и Рогаеву Евгению Ивановичу за конструктивные замечания, высказанные ими на стадии апробации диссертации.

Список цитируемой литературы

1. 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. 466-478.
2. Иллариошкин С.Н. // Конформационные болезни мозга. – Москва. - Янус-К. - 2003. – 248 с.
3. Иллариошкин С.Н. Современные подходы к лечению болезни Паркинсона. // Нервные болезни. – 2004. - №4. – С. 14-21.
4. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. и др. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2011. - Т. 5 (4). – С. 37-45.
5. Лебедева О.С., Сюсина М.А., Иллариошкин С.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А. Перспективы и проблемы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в исследовании нейродегенеративных заболеваний. // Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина. / под ред. В.А. Тачука. – Москва. - МАКС Пресс. - 2012.
6. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. // Нейрохимия. – 2013. – №3. – С. 233-241.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – Москва. – «МИР». – 1984. – 478 с.
8. 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 из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. – Т. VI. - № 4. С. 1-7.
9. Н.А. Фонсова, В.А. Дубынин. // Функциональная анатомия нервной системы: Учебное пособие для вузов. — Москва. - Издательство «Экзамен». - 2004. - 192 с.

10. Шутова М.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Получение и характеристика клеток человека с индуцированной плюрипотентностью. // *Acta Naturae*. - 2009. - № 2. - Т.5. - С. 104-106.
11. Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. // *Эпигенетика*. – Москва. – Техносфера. - 2010.- 496с. - ISBN 978-5-94836-257-1.
12. Aerts L., Craessaerts K., De Strooper B., Morais V.A. PINK1 kinase catalytic activity is regulated by phosphorylation on serines 228 and 402. // *J. Biol. Chem.* – 2015. - №290(5). – P. 2798-811.
13. Alieva A.Kh., Shadrina M.I., Filatova E.V., Karabanov A.V., Illarioahkin S.N., Limborska S.A., Slominsky P.A. Involvement of endocytosis and alternative splicing in the formation of pathological process in the early stages of Parkinson's disease. // *BioMed Research International*. – 2014. – №2014. – Article ID 718732. – p. 6.
14. Andres-Mateos E., Perier C., Zhang L., Blanchard-Fillion B., Greco T.M., Thomas B., Ko H.S., Sasaki M., Ischiropoulos H., Przedborski S., Dawson T.M., Dawson V.L. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. - №104. – P. 14807–14812.
15. Bading H., Ginty D.D., Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. // *Science*. – 1993. – Vol. 260. – P. 181-186.
16. Ban H., Nishishita N., Fusaki N., Tabata T., Saeki K., Shikamura M., Takada N., Inoue M., Hasegawa M., Kawamata S., Nishikawa S.-I. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2011. - №108(34). – P. 14234–14239.
17. Bandopadhyay R., Kingsbury A.E., Cookson M.R., Reid A.R., Evans I.M., Hope A.D., Pittman A.M., Lashley T., Canet-Aviles R., Miller D.W., McLendon C., Strand C., Leonard A.J., Abou-Sleiman P.M., Healy D.G., Ariga H., Wood N.W., de Silva R., Revesz T., Hardy J.A., Lees A.J. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. // *Brain*. – 2004. - №127 (Pt 2). - P. 420–430.
18. Benjamini Y. and Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. – 1995. - Vol. 57. - № 1. - P. 289-300.
19. Bhutani K., Nazor K.L., Williams R., Tran H., Dai H., Džakula Ž., Cho E.H., Pang A.W., Rao M., Cao H., Schork N.J., Loring J.F. Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. // *Nat Commun*. – 2016. - №7. – 10536.
20. Bird A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. // *Nature*. – 1986. - №321. – P. 209-313.

21. Blackinton J., Kumaran R., van der Brug M.P., Ahmad R., Olson L., Galter D., Lees A., Bandopadhyay R., Cookson M.R. Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. // *Neurosci. Lett.* – 2009. - №452. P. 8–11.
22. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., Gnirke A., Eggan K., Meissner A. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines // *Cell.* - 2011. - Vol. 4. - № 144(3). - P. 439-452.
23. Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive earlyonset parkinsonism. // *Science.* – 2003. - №299. – P. 256–259.
24. Boué, S., Paramonov, I., Barrero, M. J. & Izpisua Belmonte, J. C. Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate? // *PLoS ONE.* – 2010. - №5. - e12664.
25. Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G., Lengner C.J., Wernig M., Suh H., Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. // *Cell Stem Cell.* - 2008. – №2(2). – P. 151-159.
26. Brandenberger R., Khrebtukova I., Thies R.S., Miura T., Jingli C., Puri R., Vasicek T., Lebkowski J., Rao M. MPSS profiling of human embryonic stem cells. // *BMC Developmental Biology.* – 2005. – №4. – P. 10-26.
27. Briggs R., King T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. // *Proc. Nat.l Acad. Sci.* – 1952. – №38. – P. 455–463.
28. Brody T.M., Larner J., Minneman K.P. // *Human Pharmacology: molecular and clinical.* 3rd edition. – Mosby, St. Louis, MO. – 1998.
29. Büchel F., Rodriguez N., Swainston N., Wrzodek C., Czauderna T., Keller R., Mittag F., Schubert M., Glont M., Golebiewski M., van Iersel M., Keating S., Rall M., Wybrow M., Hermjakob H., Hucka M., Kell D.B., Müller W., Mendes P., Zell A., Chaouiya C., Saez-Rodriguez J., Schreiber F., Laibe C., Dräger A., Le Novère N. Path2Models: large-scale generation of computational models from biochemical pathway maps. // *BMC systems biology.* - 2013. – Vol. 7.- №1. – P. 116.
30. Byers B., Cord B., Nguyen H.N., Schüle B., Fenno L., Lee P.C., Deisseroth K., Langston J.W., Pera R.R., Palmer T.D. SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate α -synuclein and are susceptible to oxidative stress. // *PLoS One.* – 2011. - №6(11). - e26159. - doi: 10.1371/journal.pone.0026159.

31. Cai J., Yang M., Poremsky E. Kidd S., Schneider J.S., Iacovitti L. Dopaminergic Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Survive and Integrate into 6-OHDA-Lesioned Rats. // *Stem Cells Dev.* – 2010. - №19(7). – P. 1017-1023.
32. Carlson L.L. Page A.W., Bestor T.H. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. // *Genes Dev.* – 1992. - №6. – P. 2536-2541.
33. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. // *Nat. Biotechnol.* – 2009. - №27(3). – P. 275-280.
34. Chickarmane V., Troein C., Nuber U.A., Sauro H.M., Peterson C. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. // *PLoS Comput. Biol.* – 2006. - №2(9). - e123. - doi:10.1371/journal.pcbi.0020123. 2006 ; 9: 1080-1092.
35. Christman J. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. // *Oncogene.* – 2002. - №21(35). - P. 5483-5495.
36. Chung C.Y., Khurana V., Auluck P.K., Tardiff D.F., Mazzulli J.R., Soldner F., Baru V., Lou Y., Freyzon Y., Cho S., Mungenast A.E., Muffat J., Mitalipova M., Pluth M.D., Jui N.T., Schüle B., Lippard S.J., Tsai L.H., Krainc D., Buchwald S.L., Jaenisch R., Lindquist S. Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons // *Science.* - 2013. - № 342. - P. 983–987.
37. Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. Jr. Fibrils formed *in vitro* from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. // *Biochemistry.* – 2000. - №39. – P. 2552–2563.
38. Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a Dopamine- alpha -Synuclein adduct. // *Science.* – 2001. - №294. – P. 1346–1349.
39. Cooper O., Seo H., Andrabi S., Guardia-Laguarta C., Graziotto J., Sundberg M., McLean J.R., Carrillo-Reid L., Xie Z., Osborn T., Hargus G., Deleidi M., Lawson T., Bogetofte H., Perez-Tirres E., Clark L., Moskowitz C., Mazzulli J., Chen L., Volpicelli-Daley L., Romero N., Jiang H., Uitti R.J., Huang Z., Opala G., Scarffe L.A., Dawson V.L., Klein C., Feng J., Ross O.A., Trojanowski J.Q., Lee V. M.-Y., Marder K., Surmeier D.J., Wszolek Z.K., Przedborski S., Krainc D., Dawson T.M., Isacson O. Familial Parkinson's disease iPSCs show cellular deficits in mitochondrial responses that can be pharmacologically rescued. // *Sci. Transl. Med.* – 2012. - №4(141). – P. 141-190.

40. Cornetta T., Patrono C., Terrenato I., De Nigris F., Bentivoglio A.R., Testa. A, Palma.V, Poggioli T., Padua L., Cozzi R. Epidemiological, clinical, and molecular study of a cohort of Italian Parkinson disease patients: association with glutathione-S-transferase and DNA repair gene polymorphisms. // Cell Mol. Neurobiol. – 2013. - №33(5). – P. 673-680.
41. Davie C. A. A review of Parkinson's disease // Br. Med. Bull. — 2008. — T. 86. — P. 109—127.
42. Dean W., Santos R., Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following nuclear transfer. // Semin. Cell Dev. Biol. // 2003. - №14. – P. 93-100.
43. Doi D., Samata B., Katsukawa M., Kikuchi T., Morizane A., Ono Y., Sekiguchi K., Nakagawa M., Parmar M., Takahashi J. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. // Stem Cell Reports. - 2014 - №2(3) – P. 337-350.
44. Drouin-Ouellet J. and Barker R. A. Parkinson's Disease in a Dish: What Patient Specific-Reprogrammed Somatic Cells Can Tell Us about Parkinson's Disease, If Anything? // Stem Cell International. – 2012. - Article ID 926147, 10 pages doi:10.1155/2012/926147.
45. Edelmann L., Hanson P.I., Chapman E.R., Jahn R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. // EMBO J. – 1995. - №14. – P. 224–231.
46. Eggan K., Baldwin K., Tackett M., Osborne J., Gogos J., Chess A., Axel R., Jaenisch R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. // Nature. – 2004. - №428. – P. 44–49.
47. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. - 1981. - № 292. - P. 154–156.
48. Feigin A., Kaplitt M.G., Tang C. Lin T., Mattis P., Dhawan V., During M.J., Eidelberg D. Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2007 - №104(49). – P. 19559-19564.
49. Fernández-Santiago R., Carballo-Carbajal I., Castellano G., Torrent R., Richaud Y., Sánchez-Danés A., Vilarrasa-Blasi R., Sánchez-Pla A., Mosquera J.L., Soriano J., López-Barneo J., Canals J.M., Alberch J., Raya Á., Vila M., Consiglio A., Martín-Subero J.I., Ezquerro M., Tolosa E. Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. // EMBO Mol. Med. – 2015. – №7(12) – P. 1529-46.
50. Finch B.W., Ephrussi B. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture *in vitro* and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1967. - №57. – P. 615–621.

51. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H., Saito M., Tsuji S., Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. // *Ann Neurol.* – 2002. - №51(3). – P. 296–301.
52. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. 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. - № 85(8). - P. 348-62.
53. Gandhi S., Muqit M.M., Stanyer L., Healy D.G., Abou-Sleiman P.M., Hargreaves I., Heales S., Ganguly M., Parsons L., Lees A.J., Latchman D.S., Holton J.L., Wood N.W., Revesz T. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. // *Brain.* – 2006. - №129(Pt 7). – P. 1720–1731.
54. Gardner R.C., Burke J.F., Nettiksimmons J., Goldman S., Tanner C.M., Yaffe K. Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease. // *Annals of Neurology.* – 2015. - №77(6). – P. 987–995.
55. Gilbert S.F. // *Developmental biology.* – Sunderland, MA. - Sinauer Associates, Inc. – 2003. - ISBN 0-87893-258-5.
56. Glaab E., Schneider R. Comparative pathway and network analysis of brain transcriptome changes during adult aging and in Parkinson's disease. // *Neurobiology of Disease.* – 2015. – №74. – P. 1-13.
57. Gong Y., Zack T.I., Morris L.G.T., Lin K., Hukkelhoven E., Raheja R., Tan I-L., Turcan S., Veeriah S., Meng S., Viale A., Schumacher S.E., Palmedo P., Beroukheim R., Chan T.A. Pan-cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins. // *Nature Genetics.* – 2014. - doi:10.1038/ng2981.
58. Goridis, C., Brunet J.-F. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. // *Semin Cell Biol.* – 1992. - №3. – P. 189–197.
59. Greggio E., Bisaglia M., Civiero L., Bubacco L. Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? // *Mol. Neurodegener.* – 2011. - №6. – P. 6.
60. Groß B., Sgodda M., Rasche M., Schambach A., Göhring G., Schlegelberger B., Greber B., Linden T., Reinhardt D., Cantz T., Klusmann J.H. Improved generation of patient-specific induced pluripotent stem cells using a chemically-defined and matrigel-based approach. // *Curr. Mol. Med.* – 2013. - №13(5). – P. 765-76.
61. Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1962. - №10. – P. 622–640.

62. Gurdon J.B., Laskey R.A., Reeves O.R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1975. - №34. – P. 93–112.
63. Gurdon J.B., Byrne J.A., Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. - №100. P. 11819–11822.
64. Gusdon A.M., Chu C.T. To eat or not to eat: neuronal metabolism, mitophagy, and Parkinson's disease. // *Antioxidants and redox signaling.* – 2011. - №14(10). – P. 1979-1987.
65. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creighton M.P., Steine E.J., Cassady J.P., Foreman R., Lengner C.J., Dausman J.A., Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency // *Cell.* - 2008. - № 133. - P. 250-264.
66. Hargus G., Cooper O., Deleidi M., Levy A., Lee K., Marlow E., Yow A., Soldner F., Hockemeyer D., Hallett P.J., Osborn T., Jaenisch R., Isacson O. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. - №107(36). – P. 15921-15926.
67. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H., Yamaguchi S., Kono T., Nakano T., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. // *Mech. Dev.* – 2005. - №122(1). – P. 67-79.
68. Hattori N., Nishino K., Ko Y.G., Ohgane J., Tanaka S., Shiota K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. // *J. Biol. Chem.* – 2004. - 279 (47). – P. 17063-17069.
69. Hattori N., Imao Y., Nishino K., Ohgane J., Jagi S., Tanaka S., Shiota K. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. // *Genes Cells.* – 2007. - №12(3). – P. 387-396.
70. Hay D.C., Sutherland L., Clark J., Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. // *Stem Cells.* – 2004. - №22. – P. 225-235.
71. Healy D.G., Falchi M., O'Sullivan S.S., Bonifati V., Durr A., Bressman S., Brice A., Aasly J., Zabetian C.P., Goldwurm S., Ferreira J.J., Tolosa E., Kay D.M., Klein C., Williams D.R., Marras C., Lang A.E., Wszolek Z.K., Berciano J., Schapira A.H., Lynch T., Bhatia K.P., Gasser T., Lees A.J., Wood N.W. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. // *Lancet Neurol.* – 2008. - №7. – P. 583–590.

72. Hegarty S.V., Sullivan A.M., O'Keefe G. W. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. // *Developmental Biology*. – 2013. - №379 – P. 123–138.
73. Hochbaum D., Barila G., Ribeiro-Neto F., Altschuler D.L. Radixin Assembles cAMP Effectors Epac and PKA into a Functional cAMP Compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. // *J. Biol. Chem.* – 2011. - №286(1). – P. 859–866.
74. Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. // *Nature*. - 2002a. - №415. – P. 1035–1038.
75. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation: Lessons from frogs and mice. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* - 2002b. - №14. – P. 741–748.
76. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. // *Science*. – 2013. - №341(6146). - P. 651–654.
77. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. // *Nature Biotechnology*. - 2008a. - № 26. – P. 795-797.
78. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D.A. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. // *Nature Biotechnology*. - 2008b. - №26(11). – P. 1269–1275.
79. Humpherys D., Eggan K., Akutsu H., Friedman A., Hochedlinger K., Yanagimachi R., Lander E.S., Golub T.R., Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. - №99. – P. 12889–12894.
80. Imaizumi Y., Okada Y., Akamatsu W., Koike M., Kuzumaki N., Hayakawa H., Nihira T., Kobayashi T., Ohyama M., Sato S., Takanashi M., Funayama M., Hirayama A., Soga T., Hishiki T., Suematsu M., Yagi T., Ito D., Kosakai A., Hayashi K., Shouji M., Nakanishi A., Suzuki N., Mizuno Y., Mizushima N., Amagai M., Uchiyama Y., Mochizuki H., Hattori N., Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. // *Molecular Brain*. – 2012. - №5. – P.35.
81. Inoue K., Wakao H., Ogonuki N., Miki H., Seino K., Nambu-Wakao R., Noda S., Miyoshi H., Koseki H., Taniguchi M., et al. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. // *Curr. Biol.* – 2005. - №15. – P. 1114–1118.
82. Ji H., Zhang X., Oh S., Mayhew C.N., Ulm A., Sominemi H.K., Eriksen M., Wells J.M., Khurana Hershey G.K. Dynamic transcriptional and epigenetic reprogramming from pediatric

- nasal epithelial cells to induced pluripotent stem cells. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2015. - №135(1). – P. 236-244.
83. Jain S., Wood N.W., Healy D.G. Molecular pathways in Parkinson's disease: a review. // Clinical Science. – 2005. - №109. – P. 355-364.
 84. Jiang J., Chan Y.S., Loh Y.H., Cai J., Tong G.Q., Lim C.A., Robson P., Zhong S., Ng H.H. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. // Nat. Cell Biol. – 2008. - №10. – P. 353-360.
 85. Jiang H., Ren Y., Yuen E.Y., Zhong P., Ghaedi M., Hu Z., Azabdaftari G., Nakaso K., Yan Z., Feng J. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. // Nat Commun. – 2012. - №3. – P. 668.
 86. Kahan B.W., Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal *in vitro* cultures of mouse testicular teratoma. // J. Natl. Cancer Inst. – 1970. - №44. – P. 1015–1036.
 87. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. // Nature. – 2009. - №458 (7239). – P. 771–775.
 88. Kasten M., Chade A., Tanner C.M. Epidemiology of Parkinson's disease. In: Parkinson's disease and related disorders. Advances in neurology. // Advances in neurology. - 2007. - V.83. - Part I. - P.129–151.
 89. Keane P.C., Kurzawa M., Blain P.G., Morris C.M. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. // SAGE-Hindawi Access to Research Parkinson's disease. – 2011. – V. 2011. - article ID 716871. - 18 pages.
 90. Khoda T., Kishigami S., Kaneko-Ishino T., Wakayama T., Ishino F. Gene expression profile normalization in cloned mice by trichostatin A treatment. // Cell Reprogram. – 2012. - №14(1). – P. 45–55.
 91. Kim J.B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastiano V., Araúzo-Bravo M.J., Ruau D., Han D.W., Zenke M., Schöler H.R. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors // Nature. - 2008. - № 454. - P. 646-650.
 92. Kim K., Zhao R., Doi A., Ng K., Unternaehrer J., Cahan P., Hougguang H., Loh Y.H., Aryee M.J., Lenseh M.W., Li H., Collins J.J., Feinberg A.P., Daley G.Q. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. // Nat. Biotechnol. – 2011. - №29(12). –P. 1117-1119.
 93. King T.J., Briggs R. Changes in the nuclei of differentiating gastrula cells, as demonstrated by nuclear transplantation. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1955. - №41. – P. 321–325.

94. Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. // *Nature*. – 1998. - №392. – P. 605–608.
95. Kleinsmith L.J., Pierce G.B. Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. // *Cancer Res.* – 1964. - №24. - P. 1544–1551.
96. Ko K., Araúzo-Bravo M.J., Kim J., Stehling M., Schöler H.R. Conversion of adult mouse unipotent germline stem cells into pluripotent stem cells. // *Nature protocols*. – 2010. – V. 5. – №5. – P. 921-928.
97. Kriks S., Shim J.-W., Piao J. Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., Yang L., Beal M.F., Surmeier D.J., Kordower J.H., Tabar V., Studer L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. // *Nature*. – 2011. - №480. – P. 547-553.
98. Kudva Y.C., Ohmine S., Greder L.V., Dutton J.R., Armstrong A., De Lamo J.R., Khan Y.K., Thatava T., Hasengawa M., Fasaki N., Slack J.M., Ikeda Y. Transgen-free disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with type1 and 2 diabetes. // *Stem Cells Transl Med.* – 2012. - №1(6). – P. 451-461.
99. Kumar A., Cookson M.R. Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson disease. // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2011. - №13. - e20.
100. Kumaran R., Vandrovcova J., Luk C., Sharma S., Renton A., Wood N.W., Hardy J.A., Lees A.J., Bandopadhyay R. Differential DJ-1 gene expression in Parkinson's disease. // *Neurobiol. Dis.* – 2009. - №36. – P. 393–400.
101. Kuroya M, Ishida N. Newborn virus pneumonitis (type Sendai) II The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity. // *Yokohama Med. Bull.* – 1953. - №4(4). – P. 217–33.
102. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // *Cell Cycle*. - 2010. - № 9. - P. 937–946.
103. Larsen N.J., Ambrosi G., Mullett S.J., Berman S.B., Hinkle D.A. DJ-1 knock-down impairs astrocyte mitochondrial function. // *Neuroscience*. – 2011. - №196. – P. 251–264.
104. de Lau L.M.L., Breteler M.M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. / *Lancet Neurol.* - 2006. - №5. – P. 525-535.
105. Lee K.-H. Conditions and techniques for mouse embryonic stem cell derivation and culture. // <http://dx.doi.org/10.5772/55105>
106. Lee P.C., Bordelon Y., Bronstein J., Ritz B. Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease. // *Neurology*. – 2012. - №79(20). – P. 2061-2066.

107. Lewis P.A., Greggio E., Beilina A., Jain S., Baker A., Cookson M.R. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. - №357(3). – P. 668–671.
108. Li J., Ishii T., Feinstein P., Mombaerts P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. // *Nature.* – 2004. - №428. – P. 393–399.
109. Li J.Y., Pu M.T., Hirasawa R., Li B.Z., Huang Y.N., Zeng R., Jing N.H., Chen T., Li E., Sasaki H., Xu G.L. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. // *Mol. Cell Biol.* 2007; 27(24): 8748-8759.
110. Li, X.J., Hu, B.Y., Jones, S.A., Zhang, Y.S., Lavaute, T., Du, Z.W., Zhang, S.C. Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. // *Stem Cells.* – 2008. - №26. – P. 886-893.
111. Liao J., Cui C., Chen S., Ren J., Chen J., Gao Y., Li H., Jia N., Cheng L., Xiao H., Xiao L. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells // *Cell Stem Cell.* - 2009. - V. 9. - № 4(1). - P. 11-15.
112. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., Downes M., Yu R., Stewart R., Ren B., Thomson J.A., Evans R.M., Ecker J.R. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells // *Nature.* - 2011. - V. 3. - № 471(7336). - P. 68-73.
113. Liu G-H., Qu J., Suzuki K., Nivet E., Li M., Montserrat N., Yi F., Xu X., Ruiz S., Zhang W., Wagner U., Kim A., Ren B., Li Y., Goebel A., Kim J., Soligalla R.D., Dubova I., Thompson J., Yates III J., Esteban C.R., Sancho-Martinez I., Belmonte J.C.I. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2 // *Nature.* - 2012. - № 491. - P. 603–607.
114. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., Clark A.T., Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. // *PNAS.* – 2008. - №105(8). – P. 2883-2888.
115. Lyssiotis C.A., Foreman R.K., Steark J. Garcia M., Mathur D., Markoulaki S., Hanna J., Lairson L.L., Charette B.D., Bouchez L.C., Bollong M., Kunick C., Brinker A., Cho C.Y., Schultz P.G., Jaenisch R. // Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. / *PNAS.* - 2009. - №106(22). – P. 8912-8917.
116. Mackay-Sim A. Patient-derived stemcells: pathways to drug discovery for brain diseases. // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* – 2013. - №7. - P 1-10.
117. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. Directly reprogrammed

- fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. // *Cell Stem Cell*. – 2007. – №1. – P. 55-70.
118. Maherali, N., Hochedlinger, K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell*. – 2008. - №3. - P. 595–605.
 119. Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. Synuclein: A neuronspecific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. // *J. Neurosci.* – 1988. - №8(8). – P. 2804–2815.
 120. Martin I., Dawson V.L., Dawson T.M. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. // *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2011. - №12. – P. 301–325.
 121. Martínez-Morales P. L., Liste I. Stem Cells as *In Vitro* Model of Parkinson's Disease. // *Stem Cells Int.* – 2012. - №2012. - 980941. Published online 2012 April 30. doi:10.1155/2012/980941.
 122. Medeiros R.B., Papenfuss K.J., Hoiu B., Coley K., Jadrich J., Goh S.K., Elayaperumal A., Herrera J.E., Resnik E., Ni H.T. Novel sequential ChIP and simplified ChIP protocols for promoter co-occupancy and target gene identification in human embryonic stem cells. // *BMC Biotechnology*. – 2009. - №9. – P. 59.
 123. Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H., Werning M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B.E., Nusbaum C., Jaffe D.B., Gnirke A., Jaenisch R., Lander E.S. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. // *Nature*. – 2008. - №454(7205). – P. 766-770.
 124. Miller R.A., Ruddle F.H. Pluripotent teratocarcinoma - thymus somatic cell hybrids. // *Cell*. – 1976. - №9. – P. 45–55.
 125. Miller R.A., Ruddle F.H. Teratocarcinoma X friend erythroleukemia cell hybrids resemble their pluripotent embryonal carcinoma parent. // *Dev. Biol.* – 1977. - №56. – P. 157–173.
 126. Mizuno Y., Hattori N., Kubo S., Sato S., Nishioka K., Hatano T., Tomiyama H., Funayama M., Machida Y., Mochizuki H. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2008. - №63. – P. 2215–2227.
 127. Mochizuki H. Studies of gene therapy for Parkinson's disease. // *Rinsho Shinkeigaku*. – 2009. - №49(11). – P. 753-755.
 128. Müller L.U.W., Milsom M.D., Harris C.E., Vyas R., Brumme K.M., Parmar K., Moreau L.A., Schambach A., Park I.-H., London W.B., Strait K., Schlaeger T., DeVine A.L., Grassman E., D'Andrea A., Daley D.Q., Williams D.A. Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells. // *Blood*. – 2012. - №119(23). – P. 5449–5457.

129. Nagy A., Gocza E., Diaz E.M., Prideaux V.R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. // *Development*. – 1990. – №110(3). – P. 815-821.
130. Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J.C. Derivation of completely cell culture – derived mice from early-passage embryonic stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. - №90. – P. 8424-8428.
131. Narendra D.P., Jin S.M., Tanaka A., Suen D.F., Gautier C.A., Shen J., Cookson M.R., Youle R.J. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. // *PLoS Biol*. – 2010. - №8. - e1000298.
132. Nazor K.L., Altun G., Lynch C., Tran H., Harness J.V., Slavin I., Garitaonandia I., Müller F.J., Wang Y.C., Boscolo F.S., Fakunle E., Dumevska B., Lee S., Park H.S., Olee T., D'Lima D.D., Semechkin R., Parast M.M., Galat V., Laslett A.L., Schmidt U., Keirstead H.S., Loring J.F., Laurent L.C. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives // *Cell Stem Cell*. - 2012. - V. 4. - № 10(5). - P. 620-34.
133. Nefzger C.N., Su C.T., Fabb S.A., Hartley B.J., Beh S.J., Zeng W.R., Haynes J.M., Pouton C.W. Lmx1a Allows context-specific isolation of progenitors of GABAergic or dopaminergic neurons during neural differentiation of embryonic stem cells // *Stem Cells*. - 2012. - №30. – P. 1349–1361.
134. Nishimura K., Sano M., Ohtaka M., Furuta B., Umemura Y., Nakajima Y., Ikehara Y., Kobayashi T., Segawa H., Takayasu S., Sato H., Motomura K., Uchida E., Kanayasu-Toyoda T., Asashima M., Nakauchi H., Yamaguchi T., Nakanishi M. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. // *J. Biol. Chem*. – 2011 - №286(6). – P. 4760–4771.
135. Nishimura K., Murayama S., Takahashi J. Identification of Neurexophilin 3 as a Novel Supportive Factor for Survival of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors. // *Stem Cells Transl. Med*. - 2015 - №4(8) – P. 932-944.
136. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. // *PLoS Genet*. – 2011. - №7. - e1002085.
137. Noelker C., Lu L., Höllerhage M., Vulinovic F., Sturn A., Roscher R., Höglinger G.U., Hirsch E.C., Oertel W.H., Alvarez-Fischer D., Andreas H. Glucocerebrosidase deficiency and mitochondrial impairment in experimental Parkinson disease. // *J. Neurol. Sci*. - 2015. - №356(1-2). – P. 129-136.

138. Ogonuki N., Inoue K., Yamamoto Y., Noguchi Y., Tanemura K., Suzuki O., Nakayama H., Doi K., Ohtomo Y., Satoh M., Nishida A., Ogura A. Early death of mice cloned from somatic cells. // *Nat. Genet.* – 2002. - №30. – P. 253–254.
139. Okatsu K., Oka T., Iguchi M., Imamura K., Kosako H., Tani N., Kimura M., Go E., Koyano F., Funayama M., Shiba-Fukushima K., Sato S., Shimizu H., Fukunaga Y., Taniguchi H., Komatsu M., Hattori N., Mihara K., Tanaka K., Matsuda N. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. // *Nature Communications.* – 2012. - №3. – P. 1016.
140. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. // *Science.* – 2008. - №322. – P. 949-953.
141. Olanow C.W., Wunderle K.B., Kiebertz K. Milestones in movement disorders clinical trials: advances and landmark studies. // *Mov. Disord.* - 2011. - V.26. - P.1003-1014.
142. Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W., Gilks W.P., Simon J., van der Brug M., Lopez de Munain A., Aparicio S., Gil A.M., Khan N., Johnson J., Martinez J.R., Nicholl D., Carrera I.M., Pena A.S., de Silva R., Lees A., Marti-Masso J.F., Perez-Tur J., Wood N.W., Singleton A.B. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. // *Neuron.* – 2004. - №44. – P. 595–600.
143. Planello A.C., Ji J., Sharma V., Singhania R., Mbabaali F., Muller F., Alfaro J.A., Bock C., De Carvalho D., Batada N.N. Aberrant DNA methylation reprogramming during induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors // *Cell Regeneration.* – 2014. – №3. – P. 4.
144. Park I.-H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M.W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G.Q. Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. // *Cell.* – 2008. - №134(5). – P. 877-886.
145. Pesce M., Schöler H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. // *Stem Cells.* – 2001. - №19. – P. 271-278.
146. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. // *Science.* – 1997. - №276. – P. 2045–2047.
147. Qiu C., Ma Y., Wang J., Peng S., Huang Y. Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. // *Nucleic Acids Research.* – 2010. - №38(4). – P. 1240-1248.

148. Ratner M.H., Farb D.H., Ozer J., Feldman R.G., Durso R. Younger age at onset of sporadic Parkinson's disease among subjects occupationally exposed to metals and pesticides. // *Interdiscip Toxicol.* – 2014. - №7(3). – P. 123-133.
149. Razin A. and Riggs A.D. DNA methylation and gene function. // *Science.* – 1980. - №210. – P. 604-610.
150. Reinhardt P., Schmid B., Burbulla L.F., Schondorf D.C. Wagner L., Glatza M., Hoing S., Hargus G., Heck S.A., Dhingra A., Wu G., Muller S., Brockmann K., Kluba T., Maisel M., Kruger R., Berg D., Tsytsyura Y., Theil C.S., Psathaki O.-E., Klingauf J., Kuhlmann T., Klewin M., Muller H., Gasser T., Scholer H.R., Sternecker J. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links Parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. // *Cell Stem Cell.* – 2013. - №12. – P. 354-367.
151. Remenyi A., Lins K., Nissen L.J., Reinbold R., Schöler H.R., Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. // *Genes Dev.* – 2003. - №17. – P. 2048-2059.
152. Sanchez-Danes A., Richaud-Patin Y., Carballo-Carbajal I., Jiménez-Delgado S., Caig C., Mora S., Di Guglielmo C., Ezquerro M., Patel B., Giralt A., Canals J.M., Memo M., Alberch J., López-Barneo J., Vila M., Cuervo A.M., Tolosa E., Consiglio A., Raya A. Disease – specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. // *EMBO Mol. Med.* – 2012. - №4. – P. 380-395.
153. Sanchez-Danes A., Consiglio A., Richard Y., Rodrigues-Piza I., Dehay B., Edel M., Bove J., Memo M., Raya A., Izpisua Belmonte J.C. Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by lentiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. // *Hum Gene Ther.* - 2012. - №23(1). – P. 56-69.
154. Santos E., Hendrich B., Reik W., Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. // *Dev Biol.* – 2002. - №241. – P. 172-182.
155. Sarnat S.B. Clinical neuropathology practice guide 5-2013: markers of neuronal maturation. // *Clin Neuropathol.* – 2013. - №32(5). – P. 340–369.
156. Seibler P., Graziotto J., Jeong H., Simunovic F., Klein C., Krainc D. // Mitochondrial parkin recruitment in neurons derived from mutant PINK1 iPS cells. / *J. Neurosci.* - 2011. - №31(16). – P. 5970-5976.
157. Sen S., Webber P.J., West A.B. Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. // *J. Biol. Chem.* – 2009. - №284(52). – P. 36346–36356.
158. Shaltouki A., Sivapatham R., Pei Y., Gerencser A.A., Momčilović O., Rao M.S., Zeng X. Mitochondrial alterations by PARKIN in dopaminergic neurons using PARK2 patient-

- specific and PARK2 knockout isogenic iPSC lines. // *Stem Cell Reports*. – 2015. - №4(5). – P. 847–859.
159. Sharov A.A., Masui S., Sharova L.V., Piao Y., Aiba K., Matoba R., Xin L., Niwa H., Ko M.S. Identification of Pou5f1, Sox2 and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. // *BMC Genomics*. – 2008. - №9. – P. 269.
 160. Shi Y., Do J.T., Despons C., Hahm H.S., Schöler H.R., Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell*. - 2008a. - №2. – P. 525–528.
 161. Shi Y., Despons C., Do J.T., Hahm H.S., Schöler H.R., Ding S. // Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. // *Cell Stem Cell*. - 2008b. - №3. – P. 568-574.
 162. Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K., Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. // *Nat. Genet.* – 2000. - №25. – P. 302–305.
 163. Shutova M.V. Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. An integrative analysis of reprogramming in human isogenic system identified a clone selection criterion. // *Cell Cycle*. – 2016. - Feb 26:0. [Epub ahead of print].
 164. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muenter M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. // *Science*. – 2003. - №302. – P. 841.
 165. Smith J.R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W.A., Pedersen R.A. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. // *Dev. Biol.* – 2008. - №313. – P. 107–117.
 166. Smith W.C., Harland R.M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. // *Cell*. – 1992. - №70. – P. 829–840.
 167. Smith W.W., Pei Z., Jiang H., Moore D.J., Liang Y., West A.B., Dawson V.L., Dawson T.M., Ross C.A. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2005. - №102(51). – P. 18676–18681.
 168. Soldner F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., Jaenisch, R. Parkinson's disease patient-

- derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. // *Cell*. – 2009. - №136. – P. 964–977.
169. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. // *Nature*. – 1997. - №388. – P. 839–840.
 170. Stadtfeld, M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. // *Nature*. – 2010. - №465. – P. 175–181.
 171. Stevens L.C., Little C.C. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1954. - №40. – P. 1080–1087.
 172. Stiles J. // *The fundamentals of brain development*. - Cambridge, MA. - Harvard University Press. - 2008.
 173. Su Y.-C. and Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. // *Human Molecular Genetics*. – 2013. - №22(22). – P. 4545–4561.
 174. Sudhaman S., Prasad K., Behari M., Muthane U.B., Juyal R.C., Thelma B.K. Discovery of a frameshift mutation in podocalyxin-like (PODXL) gene, coding for a neural adhesion molecule, as causal for autosomal-recessive juvenile Parkinsonism. // *J. Med. Genet.* – 2016. - [Epub ahead of print].
 175. Sullivan G.J., Bai Y., Fletcher J., Wilmut I. Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2010. - №16(12). – P. 880–885.
 176. Sun N., Panetta N.J., Gupta D.M., Wilsona K.D., Leea A., Jiaa F., Hua S., Cherryc A.M., Robbinsd R.C., Longakerb M.T., Wu J.C. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. // *PNAS*. - 2009. - №106(37). – P. 15720–15725.
 177. Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins. // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2008. - №270. – P. 225–317.
 178. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell*. – 2006. - №126. - P. 663–676.
 179. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. // *Cell*. – 2007. - №131. – P. 861–872.
 180. Takeda J., Seino S., Bell G.I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. // *Nucleic Acid Research*. – 1992. - №20(17). – P. 4613–4620.

181. Takeda A., Igarashi H., Kawada M., Tsukamoto T., Yamamoto H., Inoue M., Iida A., Shu T., Hasegawa M., Matano T. Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques // *Vaccine*. - 2008. - V. 9. - № 26(52). - P. 6839-43.
182. Tamashiro K.L., Wakayama T., Akutsu H., Yamazaki Y., Lachey J.L., Wortman M.D., Seeley R.J., D'Alessio D.A., Woods S.C., Yanagimachi R., Sakai R.R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. // *Nat. Med.* – 2002. - №8. – P. 262–267.
183. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease. // *Hum. Mol. Genet.* - 2007. - V.16. - P. R183-R194.
184. Thomas K.J., McCoy M.K., Blackinton J., Beilina A., van der Brug M., Sandebring A., Miller D., Maric D., Cedazo-Minguez A., Cookson M.R. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. - №20. – P. 40–50.
185. Thompson L., Barraud P., Andersson E., Kirik D., Bjorklund A. Identification of Dopaminergic Neurons of Nigral and Ventral Tegmental Area Subtypes in Grafts of Fetal Ventral Mesencephalon Based on Cell Morphology, Protein Expression, and Efferent Projections. // *The Journal of Neuroscience*. - 2005 - №25(27). – P. 6467– 6477.
186. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. - 1998. - № 282. - P. 1145–1147.
187. Thrasher A.J., Gaspar H.B., Baum C., Modlich U., Schambach A., Candotti F., Otsu M., Sorrentino B., Scobie L., Cameron E., Blyth K., Neil J., Abina S.H., Cavazzana-Calvo M., Fischer A. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. // *Nature*. – 2006. - №443(7109). - E5-6. - discussion E6-7.
188. Tiemann U., Wu G., Marthaler A.G., Schöler H.R., Tapia N. Epigenetic Aberrations Are Not Specific to Transcription Factor-Mediated Reprogramming. // *Stem Cell Reports*. – 2016. – V. 12. - №6(1). – P. 35-43.
189. Tolosa E., Jankovic J.J. Parkinson's disease and movement disorders // *Neuropathology of movement disorders* / Dickson D. V. — Lippincott Williams & Wilkins. — 2007. — C. 271—283. — ISBN 0-7817-7881-6.
190. Tong Y., Glaime E., Yamaguchi H., Ichimura T., Liu Y., Si H., Cai H., Bonventre J.V., Shen J. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes age-dependent bi-phasic alterations of the autophagy pathway. // *Molecular neurodegeneration*. – 2012. – V.7. - №2. – P. 1-16.
191. Valente E.M., Abou-Sleiman P.M., Caputo V., Muqit M.M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A.R., Healy D.G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-

- Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W.P., Latchman D.S., Harvey R.J., Dallapiccola B., Auburger G., Wood N.W. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. // *Science*. – 2004. - №304. – P. 1158–1160.
192. Wakayama T., Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. // *Nat. Genet.* – 1999. – 22. – P. 127–128.
 193. Wang J., Levasseur D.N., Orkin S.H. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. - №105. – P. 6326-6331.
 194. Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., Zhang, B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. // *Nucleic Acids Res.* - №41(Web Server issue). – P. W77-83.
 195. Wang, T., Wang, B. Association between Glutathione S-transferase M1/Glutathione S-transferase T1 polymorphisms and Parkinson's disease: a meta-analysis. // *J. Neurol. Sci.* – 2014. - №338(1-2). – P. 65-70.
 196. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schlaeger T.M., Rossi D.J. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. // *Cell Stem Cell*. – 2010. - №7. – P. 1-13.
 197. Wernig M., Zhao J-P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. - №105 (15). – P. 5856-5861.
 198. West A.B., Moore D.J., Biskup S., Bugayenko A., Smith W.W., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. - 2005. - №102(46). – P. 16842–16847.
 199. Whitworth A.J., Pallanck L.J. The PINK1/Parkin pathway: a mitochondrial quality control system? // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2009. - №41. – P. 499–503.
 200. Wiedenmann B., Franke W.W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. // *Cell*. – 1985. - №4. – P. 1017–1028.
 201. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. // *Nature*. – 1997. - №385. – P. 810–813.
 202. Wu Z., Chen J., Ren J., Bao L., Liao J., Cui C., Rao L., Li H., Gu Y., Dai H., Zhu H., Teng X., Cheng L., Xiao L. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system // *J. Mol. Cell. Biol.* // 2009. - № 1(1). - P. 46-54.

203. Wurst W., Bally-Cuif L. Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmus organizer. // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2001. - №2. – P. 99-108.
204. Xu B., Zhang K., Huang Y. Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. // *RNA*. – 2009. - №15. – P. 357-361.
205. Yang F., Jiang Q., Zhao J., Ren Y., Sutton M.D., Feng J. Parkin stabilizes microtubules through strong binding mediated by three independent domains. // *J. Biol. Chem.* – 2005. - №280(17). – P. 17154-62.
206. Yang W., Chen L., Ding Y., Zhuang X., Kang U.J. Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. - №16(23). – P. 2900–10.
207. Yao S., Sukonnik T., Kean T., Bharadwaj R.R., Pasceri P., Ellis J. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. // *Mol. Ther.* – 2004. - №10. – P. 27–36.
208. Yonemitsu Y., Kitson C., Ferrari S., Farley R., Griesenbach U., Judd D., Steel R., Scheid P., Zhu J., Jeffery P.K., Kato A., Hasan M.K., Nagai Y., Masaki I., Fukumura M., Hasegawa M., Geddes D.M., Alton E.W. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus // *Nat. Biotechnol.* - 2000. - № 18(9). - P. 970-3.
209. Youle R.J., Narendra D.P. Mechanisms of mitophagy. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2011. - №12. – P. 9–14.
210. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. // *Science*. – 2007. - №318. – P. 1917.
211. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. // *Science*. – 2009. - №324(5928). – P. 797-801.
212. Yu P.B., Hong C.C., Sachidanandan C., Babitt J.L., Deng D.Y., Hoynig S.A., Lin H.Y., Bloch K. D., Peterson R.T. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. // *Nature Chemical Biology*. – 2008. - №4(1). –P. 33-41.
213. Yuan S.H., Martin J., Elia J., Flippin J., Paramban R.I., Hefferan M.P., Vidal J.G., Mu Y., Killian R.L., Israel M.A., Emre N., Marsala S., Marsala M., Gage F.H. Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. // *PLOS one*. – 2011. - №6(3). - e17540.

214. Zaehres H., Lensch M.W., Daheron L., Stewart S.A., Itskovitz-Eldor J., Daley G.Q. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. // *Stem Cells*. – 2005. - №23. – P. 299-305.
215. Zhao X.-Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.-L., Ma Q.-W., Wang L., Zeng F., Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. // *Nature*. – 2009. - №461. – P. 86-90.
216. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Schöler H.R., Duan L., Ding S.. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. // *Cell Stem Cell*. – 2009. - №4. – P. 381-384.
217. Zhou W., Zhu M., Wilson M.A., Petsko G.A., Fink A.L. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. // *J. Mol. Biol.* – 2006. - №356. – P. 1036–1048.
218. Zimprich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B., Stoessl A.J., Pfeiffer R.F., Patenge N., Carbajal I.C., Vieregge P., Asmus F., MullerMyhsok B., Dickson D.W., Meitinger T., Strom T.M., Wszolek Z.K., Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. // *Neuron*. – 2004. - №44. – P. 601–607.

Приложения**Приложение 1**

В таблице приведены кластеры дифференциально экспрессированных генов, полученные при сравнении нейрональной популяции на 34 день дифференцировки с нейрональной популяцией на 54 день дифференцировки. Сравнимые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH+ нейроны. Сравнимые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L и IPSRG6L.

	Кластер	P value*	Число генов
Экспрессия повышена на 34 день дифференцировки	Mitotic cell cycle	2.87e-69	103
	Cell cycle phase	7.74e-69	106
	Cell cycle process	1.97e-66	112
	M phase of mitotic cell cycle	7.50e-50	66
	Nuclear division	1.41e-49	65
	Mitosis	1.41e-49	65
	M phase	4.23e-49	74
	Organelle fission	4.23e-49	66
	Cell division	3.50e-44	66
	Protein binding	2.90e-10	148
	Microtubule motor activity	4.09e-08	12
	Heterocyclic compound binding	5.61e-08	115
	Organic cyclic compound binding	8.04e-08	115
	ATP binding	5.93e-07	47
	Adenyl ribonucleotide binding	7.30e-07	47
	Nucleoside phosphate binding	7.30e-07	64
	Adenyl nucleotide binding	7.30e-07	47
	Nucleotide binding	7.30e-07	64
	Chromosome	5.29e-40	67
	Chromosomal part	2.97e-37	60
	Condensed chromosome	4.33e-36	39
	Chromosome, centromeric region	5.39e-34	36

	Nuclear part	2.52e-32	121
	Nuclear lumen	1.21e-30	112
	Condensed chromosome, centromeric region	3.92e-30	28
	Intracellular non-membrane-bounded organelle	3.92e-30	131
	Non-membrane-bounded organelle	3.92e-30	131
Экспрессия повышена на 54 день дифференцировки	Single organism signaling	0.0053	56
	Cell communication	0.0053	57
	Regulation of system process	0.0057	13
	Regulation of neuronal synaptic plasticity	0.0057	5
	System process	0.0057	28
	Nervous system development	0.0066	28
	Signal transduction	0.0084	49
	Regulation of transmission of nerve impulse	0.0084	8
	Calcium channel activity	0.0014	7
	Calcium ion transmembrane transporter activity	0.0019	7
	Divalent inorganic cation transmembrane transporter activity	0.0048	7
	Ionotropic glutamate receptor activity	0.0088	3
	Cation channel activity	0.0088	9
	Ion gated channel activity	0.0088	9
	Metal ion transmembrane transporter activity	0.0088	10
	Extracellular-glutamate-gated ion channel activity	0.0088	3
	Gated channel activity	0.0088	9
	Ion channel activity	0.0119	10
	Synaptic vesicle	0.0017	7
	Neuron projection	0.0034	15
	Ionotropic glutamate receptor complex	0.0034	4
	Clathrin-coated vesicle	0.0040	8
	Intrinsic to membrane	0.0101	57
	Synaptic vesicle membrane	0.0101	4
	Growth cone	0.0101	5
	Coated vesicle	0.0101	8
	Site of polarized growth	0.0107	5

* - здесь и далее P value рассчитан по методу Benjamini & Hochberg (Benjamini Y. and Hochberg Y., 1995). Достоверными считали значения P value < 0,05.

Приложение 2

В таблице приведены кластеры дифференциально экспрессированных генов, полученные при сравнении нейрональной популяции на 34 день дифференцировки с нейрональной популяцией на 75 день дифференцировки. Сравнимые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH+ нейроны. Сравнимые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L, IPSRG6L и IPSRG10S.

	Кластер	P value	Число генов
Экспрессия повышена на 34 день дифференцировки	Mitotic cell cycle	1.45e-35	140
	Cell cycle phase	1.45e-35	148
	Cell cycle process	1.45e-35	167
	Nucleic acid metabolic process	6.43e-35	409
	Nucleobase-containing compound metabolic process	4.21e-28	437
	Heterocycle metabolic process	3.80e-27	443
	Cellular aromatic compound metabolic process	1.23e-26	442
	Cellular nitrogen compound metabolic process	1.07e-25	452
	Organic cyclic compound metabolic process	1.33e-25	449
	Nucleic acid binding	3.32e-23	296
	Heterocyclic compound binding	3.06e-17	399
	Organic cyclic compound binding	3.63e-17	401
	DNA binding	3.64e-14	205
	RNA binding	2.65e-11	96
	Helicase activity	7.96e-09	30
	Protein binding	1.13e-08	465
	Nucleotide binding	2.07e-05	178
	Nucleoside phosphate binding	2.07e-05	178
	Nuclear part	1.82e-37	309
	Nuclear lumen	2.36e-35	282
	Intracellular organelle lumen	7.64e-31	307
	Organelle lumen	8.64e-30	307
	Membrane-enclosed lumen	3.63e-29	308
	Organelle	1.31e-28	677
	Intracellular organelle	1.61e-28	676

	Chromosome	3.84e-28	106
	Intracellular part	5.56e-28	739
	Single-organism process	4.08e-15	842
Экспрессия повышена на 75 день дифференцировки	Single-multicellular organism process	4.55e-15	653
	Response to stimulus	7.79e-14	741
	Single organism signaling	8.41e-14	554
	Cell communication	1.14e-13	565
	System development	2.00e-13	441
	Biological adhesion	2.46e-12	159
	Cell adhesion	3.98e-12	158
	Calcium ion binding	9.45e-08	108
	Carbohydrate derivative binding	1.27e-06	43
	Monosaccharide binding	4.37e-06	23
	Extracellular matrix binding	4.37e-06	16
	Protein binding	1.03e-05	729
	Receptor binding	1.57e-05	157
	Glycosaminoglycan binding	8.36e-05	36
	Carbohydrate binding	0.0002	47
	Peptidase regulator activity	0.0002	39
	L-ascorbic acid binding	0.0003	10
	Extracellular region part	1.80e-18	188
	Extracellular matrix	3.11e-18	99
	Cytoplasmic part	7.15e-15	731
	Vesicle	3.32e-14	159
	Membrane	4.02e-14	817
	Cytoplasmic vesicle	5.43e-14	153
	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle	1.20e-13	144
	Membrane-bounded vesicle	1.62e-13	146
	Proteinaceous extracellular matrix	5.06e-13	78

Приложение 3

В таблице приведены гены, участвующие в работе лизосом и фагосом, экспрессия которых повышена в здоровых нейронах, дифференцированных из IPSRG10S, на 75 день дифференцировки по сравнению со здоровыми нейронами, дифференцированными из IPSRG2L и IPSRG6L, на 34 день дифференцировки. Кластеры выявлены с помощью KEGG Pathway анализа ($p < 0,05$).

Ген	Белок	Изменение экспрессии в разы	Кластер
CTSH	cathepsin H	8.92	Lysosome
DNASE2	deoxyribonuclease II, lysosomal	4.91	
TPP1	tripeptidyl peptidase I	4.27	
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	4.24	
IDUA	iduronidase, alpha-L-	4.23	
HEXB	hexosaminidase B (beta polypeptide)	3.77	
CTSA	cathepsin A	3.77	
CTSD	cathepsin D	3.61	
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	3.43	
GNPTG	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit	3.42	
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	3.38	
NAGLU	N-acetylglucosaminidase, alpha	3.22	
ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	3.20	
GLB1	galactosidase, beta 1	3.17	
CD164	CD164 molecule, sialomucin	3.08	
CTSL1	cathepsin L1	3.05	
LAPTM4A	lysosomal protein transmembrane 4 alpha	2.93	
NPC2	Niemann-Pick disease, type C2	2.91	
ARSA	arylsulfatase A	2.86	

MAN2B1	mannosidase, alpha, class 2B, member 1	2.74	
CD63	CD63 molecule	2.74	
MANBA	mannosidase, beta A, lysosomal	2.70	
CTSO	cathepsin O	2.69	
PSAP	prosaposin	2.65	
FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	2.65	
IDS	iduronate 2-sulfatase	2.57	
CTSK	cathepsin K	2.55	
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	2.50	
GAA	glucosidase, alpha; acid	2.47	
SUMF1	sulfatase modifying factor 1	2.37	
PLA2G15	phospholipase A2, group XV	2.32	
CTSB	cathepsin B	2.30	
CLN5	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5	2.29	
GALC	galactosylceramidase	2.28	
GBA	glucosidase, beta, acid	2.26	
CTSC	cathepsin C	2.14	
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	2.08	
NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	2.07	
TUBA4A	tubulin, alpha 4a	166.38	Phagosome
C1R	complement component 1, r subcomponent	11.10	
HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	8.70	
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	7.57	
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	7.22	
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	6.61	
THBS2	thrombospondin 2	5.47	
HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	5.32	
COLEC12	collectin sub-family member 12	5.09	
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	5.06	
MRC2	mannose receptor, C type 2	4.49	
DYNC1I1	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	4.20	
HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	3.51	
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	3.43	

VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	3.18	
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide	3.17	
CANX	calnexin	3.05	
ITGB5	integrin, beta 5	2.90	
CTSL1	cathepsin L1	2.85	
SFTPD	surfactant protein D	2.80	
SCARB1	scavenger receptor class B, member 1	2.80	
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	2.74	
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	2.61	
ATP6V1E2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E2	2.60	
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	2.59	
ITGAV	integrin, alpha V	2.50	
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	2.50	
ATP6V0E1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1	2.18	
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	2.08	

Приложение 4

В таблице приведены гены, дифференциально экспрессированные в нейронах, дифференцированных из линий ИПСК здорового донора (IPSRG2L, IPSRG6L), на 34 день дифференцировки при сравнении с нейронами, дифференцированными из линий ИПСК пациентов с БП (мутация в гене *PARK8* – IPSPDL1.6; мутации в гене *PARK2* - IPSPDP1.5) на 34 день дифференцировки.

	Ген	Белок	Изменение экспрессии в разы
Экспрессия повышена в здоровых нейронах	HOXD3	homeobox D3	111.52
	HOXC4	homeobox C4	46.85
	HOXA5	homeobox A5	45.30
	SLC39A4	Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter), Member 4	41.64
	HOXB8	homeobox B8	29.14
	SPON1	Spondin 1	27.93
	HOPX	HOP homeobox	27.27
	HOXB5	homeobox B5	24.37
	MOXD1	Monoxygenase, DBH-Like 1	23.18
	FXVD5	FXVD Domain Containing Ion Transport Regulator 5	21.34
	C20orf103	Lysosomal-Associated Membrane Protein Family, Member 5	21.03
	CXorf1	Transmembrane Protein 257	18.62
	S100A10	S100 calcium binding protein A10	16.71
	HOXC6	homeobox C6	15.85
	ALPK2	Alpha-Kinase 2	14.47
	RELN	reelin	9.42
	CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1	8.98
	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	8.81
	TMEM166	Eva-1 Homolog A	8.21
	SLITRK2	SLIT and NTRK-like family, member 2	8.15

HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	7.83
GFRA1	GDNF family receptor alpha 1	7.30
LHX1	LIM homeobox 1	7.01
LPPR1	lipid phosphate phosphatase-related protein type 1	6.90
HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	5.69
TSHZ1	teashirt zinc finger homeobox 1	5.65
SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	5.53
ZADH2	Zinc Binding Alcohol Dehydrogenase Domain Containing 2	5.22
PGAM1	Phosphoglycerate Mutase 1 (Brain)	5.11
CABP7	calcium binding protein 7	4.93
TKTL1	transketolase-like 1	4.93
SCRT2	scratch homolog 2, zinc finger protein	4.86
TSPAN18	tetraspanin 18	4.63
PHYHIPL	Phytanoyl-CoA 2-Hydroxylase Interacting Protein-Like	4.52
CBLN1	cerebellin 1 precursor	4.46
ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB-like domain)	4.29
HS3ST3A1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	4.02
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)	4.00
PSRC1	Proline/Serine-Rich Coiled-Coil 1	3.94
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	3.91
PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	3.63
E2F7	E2F transcription factor 7	3.29
ZXDC	ZXD family zinc finger C	3.28
FBXO28	F-Box Protein 28	3.21
CUL2	cullin 2	3.19
DLX1	distal-less homeobox 1	3.15
PHCA	HTH-type transcriptional regulator PhcA	3.08
PDCL3	Phosducin-Like 3	3.03
CHURC1	Churchill Domain Containing 1	3.03
NACC2	NACC family member 2, BEN and BTB (POZ)	3.01

		domain containing	
	GIYD1	SLX1 Homolog A, Structure-Specific Endonuclease	2.97
	TTC14	tetratricopeptide repeat domain 14	2.95
	TSPAN5	Tetraspanin 5	2.94
	CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	2.93
	NKD1	naked cuticle homolog 1	2.89
	FAM46A	Family With Sequence Similarity 46, Member A	2.88
	C16orf35	Nitrogen Permease Regulator-Like 3	2.87
	LRIG1	Leucine-Rich Repeats And Immunoglobulin-Like Domains 1	2.84
	STAG3L2	stromal antigen 3-like 2	2.73
	MPED2	metallophosphoesterase domain containing 2	2.64
	MSTO1	Misato 1, Mitochondrial Distribution And Morphology Regulator	2.64
	RPL29	ribosomal protein L29	2.60
	HMGB1L1	high mobility group box 1 pseudogene 1	2.51
	JARID1A	Lysine (K)-Specific Demethylase 5A	2.50
	CBLB	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase B	2.40
	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein	2.40
	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	2.40
	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa	2.37
	GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)	2.32
Экспрессия повышена в нейронах пациентов с БП	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1	168.64
	MMRN1	multimerin 1	8.22
	C15orf59	Chromosome 15 Open Reading Frame 59	4.52
	SLC6A15	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15	4.33
	GLT25D2	glycosyltransferase 25 domain containing 2	4.15
	NTNG1	netrin G1	4.10
	AMFR	autocrine motility factor receptor, E3 ubiquitin protein ligase	3.33
	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	3.19
	PLEKHB1	pleckstrin homology domain containing, family B	3.19

		(evectins) member 1 58473 ENSG00000021300	
	MORN4	MORN Repeat Containing 4	2.82
	KCNF1	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	2.31

Приложение 5

В таблице приведены кластеры дифференциально экспрессированных генов, полученные при сравнении нейрональной популяции, дифференцированной из ИПСК здорового донора, с нейрональной популяцией, дифференцированной из ИПСК пациентов с мутацией в гене PARK8. Все сравниваемые популяции брали в анализ на 34 день дифференцировки. Сравнимые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH⁺ нейроны. Сравнимые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L, IPSRG6L и ИПСК пациента IPSPDL1.6L.

	Кластер	P value	Число генов
Экспрессия повышена в здоровых нейронах на 34 день дифференцировки	Cell cycle process	6.44e-12	104
	Cell cycle phase	8.07e-12	90
	Mitotic cell cycle	1.06e-11	84
	Cellular metabolic process	2.91e-11	469
	Single-organism metabolic process	1.63e-10	491
	Cellular nitrogen compound metabolic process	2.98e-10	335
	Nucleobase-containing compound metabolic process	4.80e-10	316
	Interphase	5.01e-10	53
	Nitrogen compound metabolic process	7.82e-10	349
	Structural constituent of ribosome	1.01e-07	27
	Nucleic acid binding	1.07e-05	195
	Organic cyclic compound binding	1.52e-05	291
	Heterocyclic compound binding	1.52e-05	289
	RNA binding	0.0003	64
	Binding	0.0003	547
	Kinase binding	0.0004	37
	DNA binding	0.0010	136
	Protein domain specific binding	0.0011	44
	Intracellular part	9.49e-22	617
	Organelle	9.60e-19	554
	Intracellular organelle	2.35e-18	552
	Membrane-bounded organelle	3.42e-15	503
	Intracellular membrane-bounded organelle	8.34e-15	501

	Cytosol	2.89e-14	177
	Nucleus	1.48e-12	342
	Macromolecular complex	5.93e-11	240
	Nucleoplasm	6.22e-11	118
Экспрессия повышена в нейронах с мутацией в гене <i>PARK8</i> на 34 день дифференцировки	Signaling	1.81e-06	204
	Single organism signaling	1.81e-06	204
	Single-organism process	1.53e-05	296
	Multicellular organismal signaling	2.16e-05	52
	Nervous system development	2.16e-05	93
	Cell-cell signaling	7.37e-05	65
	Neuron development	7.37e-05	52
	Cell development	7.37e-05	80
	Neurogenesis	7.37e-05	67
	Calcium ion binding	0.0105	40
	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	0.0222	9
	Transmembrane receptor protein kinase activity	0.0222	10
	Roundabout binding	0.0222	3
	Identical protein binding	0.0356	44
	Protein homodimerization activity	0.0445	31
	Glutathione transferase activity	0.0445	5
	Transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	0.0445	7
	Glutathione peroxidase activity	0.0445	4
	Neurofilament cytoskeleton	0.0011	5
	Synapse	0.0018	32
	Organelle membrane	0.0023	100
	Membrane-bounded vesicle	0.0023	46
	Membrane part	0.0023	220
	Cytoplasmic vesicle	0.0023	48
	Vesicle	0.0023	50
	Cell surface	0.0023	31
	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle	0.0023	45

Приложение 6

В таблице приведены гены, участвующие в работе лизосом и фагосом, экспрессия которых повышена в нейронах пациентов с мутацией в гене *PARK8* на 54 день дифференцировки по сравнению со здоровыми нейронами на 54 день дифференцировки. Сравниваемые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH+ нейроны. Сравниваемые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L, IPSRG6L и ИПСК пациентов IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L. Кластеры выявлены с помощью KEGG Pathway анализа ($p < 0,05$).

Ген	Белок	Изменение экспрессии в разы	Кластер
CD164	CD164 molecule, sialomucin	3.70	Lysosome
IDS	Iduronate 2-sulfatase	3.60	
TUBA4A	Tubulin, alpha 4a	6.85	Phagosome
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	4.82	

Приложение 7

В таблице приведены кластеры дифференциально экспрессированных генов, полученные при сравнении нейрональной популяции, дифференцированной из ИПСК здорового донора, с нейрональной популяцией, дифференцированной из ИПСК пациентов с мутацией в гене *PARK2*. Все сравниваемые популяции брали в анализ на 34 день дифференцировки.

Сравниваемые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH+ нейроны. Сравниваемые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L, IPSRG6L и ИПСК пациента IPSPDP1.5L.

	Кластер	P value	Число генов
Экспрессия повышена в здоровых нейронах на 34 день дифференцировки	nervous system development	1.66e-14	120
	system development	2.36e-11	183
	anatomical structure development	1.27e-09	195
	developmental process	1.91e-09	213
	neuron differentiation	2.05e-09	73
	generation of neurons	4.32e-09	76
	neurogenesis	1.06e-08	78
	neuron development	6.55e-08	60
	cell development	1.27e-07	89
	protein domain specific binding	0.0428	32
	neuron projection	5.89e-11	57
	cell projection	1.36e-05	70
	dendrite	6.82e-05	29
	intracellular part	8.44e-05	407
	axon	8.44e-05	25
	intracellular	9.64e-05	415
	perinuclear region of cytoplasm	0.0002	33
	intracellular organelle part	0.0002	247
	organelle part	0.0002	249
	carboxylic acid metabolic process	9.17e-07	62
	oxoacid metabolic process	7.59e-06	64
	organic acid metabolic process	1.04e-05	64

	L-serine biosynthetic process	0.0004	4
	carboxylic acid biosynthetic process	0.0004	25
	organic acid biosynthetic process	0.0004	25
	L-serine metabolic process	0.0006	5
	serine family amino acid biosynthetic process	0.0007	6
	small molecule biosynthetic process	0.0013	32
	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors	0.0004	8
	protein dimerization activity	0.0005	56
	glutathione transferase activity	0.0007	7
	frizzled binding	0.0016	7
	sequence-specific DNA binding	0.0039	40
	receptor agonist activity	0.0042	5
	aminoacyl-tRNA ligase activity	0.0109	7
	protein tyrosine phosphatase activity	0.0109	11
	ligase activity, forming carbon-oxygen bonds	0.0109	7
	intracellular part	0.0030	395
	cytoplasmic part	0.0150	235
	intracellular	0.0150	398
	membrane-bounded organelle	0.0171	316
	intracellular membrane-bounded organelle	0.0171	315
	MHC class I protein complex	0.0171	5
	mitochondrion	0.0367	65

Приложение 8

В таблице приведены гены, участвующие в работе митохондрии, экспрессия которых повыше в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациента с мутацией в гене PARK2 (IPSPDP1.5L), на 34 день дифференцировки при сравнении с нейронами, полученными из ИПСК здорового донора (IPSRG2L и IPSRG6L), на том же сроке дифференцировки.

Ген	Белок	Изменение экспрессии в разы
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	31.24
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP ⁺ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	11.56
AGXT2L2	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 2	7.39
PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	6.19
HSD17B8	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	5.76
ACAD11	acyl-CoA dehydrogenase family, member 11	5.56
CLYBL	citrate lyase beta like	5.39
PTPRH	protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	5.21
SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	5.15
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5.11
ASS1	argininosuccinate synthase 1	5.07
ECHDC3	enoyl CoA hydratase domain containing 3	4.90
NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial	4.87
COMT	catechol-O-methyltransferase	4.48
MARS	methionyl-tRNA synthetase	4.29
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	4.28
SARS	seryl-tRNA synthetase	4.16
GCK	glucokinase (hexokinase 4)	4.00
ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	3.97
TXNIP	thioredoxin interacting protein	3.92
NMNAT3	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 3	3.83
ACSF2	acyl-CoA synthetase family member 2	3.79
ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3 (E. coli)	3.53

MTHFD1L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	3.45
CPS1	carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial	3.43
HAX1	HCLS1 associated protein X-1	3.30
TIMM44	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog	2.91
COX11	COX11 cytochrome c oxidase assembly homolog	2.88
SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	2.87
MACROD1	MACRO domain containing 1	2.86
SLC25A37	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37	2.81
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	2.71
ACSS1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	2.67
SLMO1	slowmo homolog 1	2.61
MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	2.61
DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	2.56
ABHD6	abhydrolase domain containing 6	2.52
GARS	glycyl-tRNA synthetase	2.48
LIAS	lipoic acid synthetase	2.46
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	2.43
BMF	Bcl2 modifying factor	2.41
TIMM9	translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog	2.41
SURF1	surfeit 1	2.38
MRPL2	mitochondrial ribosomal protein L2	2.32
LETMD1	LETM1 domain containing 1	2.29
ADCK2	aarF domain containing kinase 2	2.26
LACTB2	lactamase, beta 2	2.25
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	2.25
CHCHD10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	2.24
TSPO	translocator protein (18kDa)	2.24
CLIC4	chloride intracellular channel 4	2.21
PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	2.21
SEPT4	septin 4	2.19
IMMP2L	IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like	2.17
BZRAP1	benzodiazapine receptor (peripheral) associated protein 1	2.16
D2HGDH	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	2.16

HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2.14
CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2	2.10
BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	2.08
RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	2.05
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide	2.05
RHBDD1	rhomboid domain containing 1	2.03
C6orf57	chromosome 6 open reading frame 57	2.94
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3	2.96
STK11	serine/threonine kinase 11	2.01

Приложение 9

В таблице приведены гены, экспрессия которых отличалась при сравнении популяции нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с БП (IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L, IPSPDP1.5L), и нейронов дифференцированных из ИПСК здорового донора (IPSRG2L, IPSRG6L). Все нейрональные культуры дифференцировали параллельно и брали в эксперимент на 54 день дифференцировки.

	Ген	Белок	Повышение экспрессии в разы
Экспрессия повышена в здоровых нейронах	HOXC8	Homeobox C8	142.08
	HOXB8	Homeobox B8	80.18
	HOXC4	Homeobox C4	42.74
	HOXB5	Homeobox B5	31.35
	LOC404266	HOXB Cluster Antisense RNA 3	9.66
	TSHZ1	Teashirt Zinc Finger Homeobox 1	6.47
	ELMOD1	ELMO/CED-12 Domain Containing 1	6.15
	CA10	Carbonic Anhydrase X	6.06
	DBC1	Bone Morphogenetic Protein/Retinoic Acid Inducible Neural-Specific 1	5.41
	BHLHE22	Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E22	5.13
	HOXB6	Homeobox B6	5.10
	RAPGEF5	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 5	4.31
	MAFB	V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B	4.29
	SLC30A3	Solute Carrier Family 30 (Zinc Transporter), Member 3	4.07
	SOCS2	Suppressor Of Cytokine Signaling 2	3.91
	CHURC1	Churchill Domain Containing 1	3.79
Экспрессия повышена в	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1	114.24
	LOC100134393	Не кодирует белок	5.97

нейронах пациентов с БП	SORCS1	Sortilin-Related VPS10 Domain Containing Receptor 1	4.13
----------------------------	--------	--	------

Приложение 10

В таблице приведены кластеры дифференциально экспрессированных генов, полученные при сравнении нейрональной популяции, дифференцированной из ИПСК здорового донора, с нейрональной популяцией, дифференцированной из ИПСК пациентов с мутацией в гене *PARK2*. Все сравниваемые популяции брали в анализ на 54 день дифференцировки. Сравниваемые популяции дифференцировались параллельно по протоколу направленной дифференцировки в TH+ нейроны. Сравниваемые популяции были дифференцированы из ИПСК здорового донора IPSRG2L, IPSRG6L и ИПСК пациента IPSPDP1.5L.

	Кластер	P value	Число генов
Экспрессия повышена в здоровых нейронах на 54 день дифференцировки	Nervous system development	8.33e-07	50
	Neurogenesis	6.94e-06	37
	Neuron differentiation	1.80e-05	33
	Generation of neurons	2.78e-05	34
	Regulation of neurogenesis	0.0002	18
	Regulation of nervous system development	0.0002	19
	System development	0.0003	69
	Anatomical structure morphogenesis	0.0003	48
	Regulation of cell differentiation	0.0003	30
	Sequence-specific DNA binding	0.0054	21
	Transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	0.0054	9
	Zinc ion transmembrane transporter activity	0.0378	3
	Neuron projection	6.20e-07	27
	Synapse	4.42e-05	20
	Axon	4.42e-05	15
	Cell projection	8.33e-05	33
	Membrane-bounded vesicle	0.0016	24
	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle	0.0018	23
	Synapse part	0.0018	14
	Axon part	0.0018	8
	Vesicle	0.0018	25
	Cytoplasmic vesicle membrane	0.0018	13

Экспрессия повышена в нейронах с мутацией в гене <i>PARK2</i> на 54 день дифференцировки	M phase of mitotic cell cycle	9.14e-14	46
	Mitosis	3.92e-13	44
	Nuclear division	3.92e-13	44
	M phase	1.29e-12	53
	Organelle fission	2.68e-12	44
	Mitotic cell cycle	1.98e-11	63
	Chromosome segregation	1.30e-10	25
	Cell cycle process	1.30e-10	74
	Cell cycle phase	1.30e-10	65
	Protein domain specific binding	0.0096	30
	Isomerase activity	0.0096	13
	Cyclin-dependent protein kinase regulator activity	0.0096	5
	Kinase binding	0.0192	23
	Glutathione transferase activity	0.0192	5
	Binding	0.0192	343
	Structural constituent of ribosome	0.0192	13
	Protein kinase binding	0.0257	21
	Aldehyde-lyase activity	0.0347	3
	Nucleus	2.87e-12	233
	Spindle	9.21e-12	31
	Intracellular non-membrane-bounded organelle	3.30e-11	165
	Intracellular	3.30e-11	389
	Non-membrane-bounded organelle	3.30e-11	165
	Condensed chromosome	7.31e-11	25
	Chromosome, centromeric region	2.30e-10	23
	Condensed chromosome, centromeric region	3.66e-10	18
	Organelle	5.54e-10	343