

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

МАЛАНХАНОВА ТУЯНА БАИРОВНА

**СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., проф. Закиян С. М.

Новосибирск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1. Болезнь Хантингтона.....	13
1.1. Общая характеристика.....	13
1.2. Основы этиопатогенеза.....	13
1.3. Лабораторная диагностика и симптоматическое лечение БХ	24
1.4. Основные модели БХ в системе <i>in vivo</i>	27
2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека как основа для создания клеточных моделей БХ.....	30
2.1. Направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в срединные шипиковые нейроны.....	35
2.2. Изогенные клеточные модели как перспективная платформа для изучения наследственных заболеваний и скрининга лекарственных препаратов	37
3. Заключение.....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
1. Конструирование вектора для экспрессии элементов системы CRISPR/Cas9	44
2. Модификация донорной плазмиды.....	44
3. Культивирование клеток линии НЕК293FT и эмбриональных фибробластов человека.....	45
4. Доставка генетических конструкций в клетки	45
4.1. Химическая трансфекция с помощью полиэтиленимина (PEI)	45
4.2. Электропорация.....	45
5. Субклонирование клеток после трансфекции.....	46
6. ПЦР-анализ клонов клеток на наличие встройки удлиненного тракта повторов CAG в первый экзон гена <i>HTT</i>	46
7. Подтверждение отсутствия нецелевых модификаций в последовательности действия системы CRISPR/Cas9	47
8. Проверка нецелевой активности системы CRISPR/Cas9	47
9. Вестерн-блот	48
10. Генотипирование экспансии тандемных CAG-повторов в первом экзоне гена <i>HTT</i> методом фрагментного анализа	49
11. Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов кожи человека	49
12. Замораживание клеток.....	50

13.	Размораживание клеток.....	50
14.	Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы 50	
15.	Анализ кариотипа.....	51
16.	Иммунофлуоресцентное окрашивание	51
17.	Спонтанная дифференцировка ИПСК <i>in vitro</i>	53
18.	Выделение РНК и синтез кДНК	54
19.	Количественная ПЦР в реальном времени.....	54
20.	Направленная дифференцировка ИПСК в СШН	55
21.	Формирование нейральных розеток.....	57
22.	Тест на чувствительность клеток к удалению BDNF	57
24.	Статистический анализ данных	58
	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	59
1.	Дизайн и проверка системы для внесения мутации в ген <i>HTT</i> человека	59
1.1.	Выбор последовательности протоспейсера для действия CRISPR/Cas9 в локусе <i>HTT</i> и внесение синонимичной замены в последовательность донорного вектора	59
1.2.	Проверка системы для внесения мутации в ген <i>HTT</i> на клетках линии НЕК293FT	61
2.	Внесение мутации в ген <i>HTT</i> эмбриональных фибробластов человека и получение клонов ИПСК с целевой мутацией.....	64
2.1.	Внесение удлиненного тракта повторов CAG в экзон 1 гена <i>HTT</i> эмбриональных фибробластов человека	64
2.2.	Проверка нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в геноме клонов фибробластов с мутацией в гене <i>HTT</i>	66
2.3.	Определение числа повторов CAG в первом экзоне гена <i>HTT</i> в клонах 2D12 и 3D8	69
2.4.	Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов человека с удлиненным трактом CAG в гене <i>HTT</i>	71
3.	Характеристика ИПСК с мутацией в гене <i>HTT</i>	73
3.1.	Кариотипирование полученных ИПСК с мутацией в гене <i>HTT</i>	73
3.2.	Анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности и самообновления	74
3.3.	Спонтанная дифференцировка ИПСК <i>in vitro</i>	76
4.	Направленная дифференцировка ИПСК с мутацией в гене <i>HTT</i> и изогенного контроля в срединные СШН и характеристика мутантного фенотипа полученных нейронов.....	77
4.1.	Дифференцировка ИПСК с мутацией в гене <i>HTT</i> и изогенного контроля в СШН.....	77

4.2.	Анализ нейронов на наличие агрегатов мутантного хантингтина	82
4.3.	Влияние мутации на ультраструктурную организацию нейронов	84
4.4.	Сравнение эффективности формирования нейральных розеток	87
4.5.	Дифференциальная чувствительность клеток-предшественников СШН к отсутствию факторов роста	88
4.6.	Уменьшение уровня N-кадгерина в предшественниках СШН с внесенной мутацией в ген <i>HTT</i>	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		93
ВЫВОДЫ		95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		96

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АСО – антисмысловые олигонуклеотиды
АТФ – аденозинтрифосфат
БСА – бычий сывороточный альбумин
БХ – болезнь Хантингтона
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – комплементарная ДНК
ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
ЛГБ – латеральный ганглионарный бугорок
ПСК – плюрипотентные стволовые клетки
ПФА - параформальдегид
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
СШН – срединные шипиковые нейроны
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
ЭТ – эмбрионидные тельца
ЭФМ – эмбриональные фибробласты мышцы
bFGF – basic fibroblast growth factor
BDNF – brain derived neurotrophic factor
CNTF – ciliary neurotrophic factor
CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9
dNTP – deoxynucleotide
DAPI - 4', 6'-диамидино-2-фенилиндола
GFP – green fluorescent protein
FBS – fetal bovine serum
NEAA – non-essential amino acids

PAM – protospacer adjacent motif

PEI – polyethylenimine

SHH – sonic hedgehog

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов, и не существует эффективных способов лечения или замедления течения болезни ввиду недостаточных знаний основ патогенеза и ограниченной доступности биологического материала для исследований. Создание моделей этих заболеваний на основе культивируемых клеток человека и выявление с помощью них конкретных молекулярных механизмов, лежащих в основе прогрессирования заболеваний, может способствовать разработке направленной и эффективной терапии. Поэтому работы по получению релевантных клеточных моделей и детальные исследования клеточных и молекулярных процессов, происходящих при нейродегенеративных заболеваниях, являются одними из важнейших задач современной биомедицины.

Болезнь Хантингтона (БХ) – это активно исследуемое нейродегенеративное наследственное заболевание, вызванное увеличением числа тринуклеотидных повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*, который кодирует белок хантингтин. Вследствие такого нарушения мутантный хантингтин содержит удлиненный полиглутаминовый тракт, из-за чего белок приобретает неправильную конформацию, не выполняет свои функции и оказывает токсический эффект на срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума. Более того, исследователями доказана прямая корреляция между числом повторов CAG и временем появления первых симптомов БХ. Потеря СШН приводит к двигательным дисфункциям, когнитивным расстройствам и, в конечном счете, смерти пациента.

Для изучения молекулярных аспектов развития БХ необходимы модельные системы, которые наиболее точно воспроизводят фенотип заболевания. Модели на основе культивируемых клеток человека являются перспективным объектом для таких исследований. Наиболее точную картину патологических процессов, происходящих при БХ, можно создать с помощью нейрональных производных, в частности СШН, полученных при направленной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека. Разработка технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открыла новые возможности

моделирования заболеваний, поскольку стало возможным получение клеточных моделей от конкретного пациента. Однако, наличие однонуклеотидных полиморфизмов в геноме клеток от разных пациентов может вносить существенный вклад в результаты исследований. Таким образом, необходима большая выборка клеток от пациентов и «здоровых» доноров, что значительно усложняет работы по изучению заболевания.

Решением данной проблемы может быть создание изогенных линий клеток. Такие линии обеспечивают адекватный «отрицательный» контроль, поскольку имеют идентичный генетический фон и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием мутации, вызывающей конкретное заболевание. Для создания изогенных линий может быть использован инструмент для редактирования генов CRISPR/Cas9, который позволяет эффективно и специфично вносить модификации в геном клеток. Так, изогенную пару клеточных линий можно получить двумя способами: первый способ – исправить мутацию в пациент-специфичных клетках, второй – внести мутацию, вызывающую заболевание, в «здоровые» клетки. Изогенные клеточные модели являются релевантной и перспективной платформой для тестирования лекарственных препаратов, а также изучения молекулярных основ развития БХ.

Цель и задачи исследования

Цель работы – создать и охарактеризовать модельную систему болезни Хантингтона на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Задачи:

1. Создать систему для внесения удлиненного тракта триплетов CAG (>36) в экзон 1 гена *HTT* человека на основе донорной плазмиды и плазмиды, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и оценить эффективность ее работы на клетках линии HEK293.
2. Внести удлиненный тракт триплетов CAG в экзон 1 гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека и репрограммировать клоны внесенной мутацией к плюрипотентному состоянию.

3. Провести характеристику клонов ИПСК с мутацией в гене *HTT* с помощью стандартных тестов на плюрипотентность.
4. Провести направленную дифференцировку ИПСК с мутацией в гене *HTT* и контрольной изогенной линии ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума и охарактеризовать мутантный фенотип полученных нейронов.

Научная новизна работы

Впервые получена клеточная система, моделирующая болезнь Хантингтона, на основе линий ИПСК, несущих 40/53 и 69/22 повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*, и изогенной линии ИПСК без мутации. При этом удлинённый тракт повторов CAG, вызывающий данное заболевание, был внесён с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации с донорной матрицей, которая была сконструирована в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Подтверждён плюрипотентный статус полученных клеточных линий с помощью ряда стандартных тестов. Кроме того, была проведена проверка активности CRISPR/Cas9 в нецелевых локусах генома клеток с помощью секвенирования по Сэнгеру. По протоколу, разработанному в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, проведена направленная дифференцировка полученных клеточных линий, изогенного контроля и положительного контроля – линия пациент-специфичных ИПСК с 47/17 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT*, в СШН стриатума. Полученные нейроны экспрессировали основные маркеры зрелых нейронов стриатума и воспроизводили патологический фенотип БХ. Более того, были выявлены новые ультраструктурные особенности мутантных нейронов с помощью электронной микроскопии.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученная изогенная модельная система позволит проводить комплексное изучение молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития БХ, а также скрининговые тестирования фармакологических препаратов. Кроме того, научные результаты, стратегии и подходы, использованные в данной работе, могут быть применены при создании изогенных клеточных моделей целого ряда

полиглутаминовых заболеваний человека, поскольку для этого необходима только замена плечей гомологии донорного вектора и подбор нового протоспейсера для действия системы CRISPR/Cas9.

Основные положения, выносимые на защиту

- Удлиненный тракт триплетов CAG (>36) внесен в первый экзон гена *HTT* культивируемых клеток человека в результате CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором.
- Срединные шипиковые нейроны стриатума, полученные при направленной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с удлиненным трактом триплетов CAG (>36) в гене *HTT*, являются моделью для изучения болезни Хантингтона.

Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Донорная последовательность с удлиненным трактом повторов CAG была сконструирована к.б.н. М.А. Сорокиным. Определение числа повторов CAG в первом экзоне гена *HTT* в полученных клетках осуществлялось к.б.н. Н.Ю. Абрамычевой. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводился совместно с к.б.н. Е.В. Григорьевой и к.б.н. С.И. Байбородиныным. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа осуществлялся к.б.н. Ю.В. Мининой. Подготовка материала и электронномикроскопический анализ был выполнен Л.А. Сульдиной.

Апробация работы

Список работ по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых журналах:

1. Grigor'eva E.V.*, **Malankhanova T.B.***, Surumbayeva A., Minina J.M., Morozov V.V., Abramychева N.Y., Illarioshkin S.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. Generation of induced pluripotent stem cell line, ICGi007-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with Huntington's disease // Stem Cell Res. 2019. Vol. 34. P. 101382. * равный вклад авторов.

2. Morozova K.N., Suldina L.A., **Malankhanova T.B.**, Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // PLoS One. 2018. Vol. 13(10). P. e0204735.
3. Шарипова Д.В., **Маланханова Т.Б.**, Малахова А.А. Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии HEK293 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21(7). С. 856-861.
4. **Malankhanova T.B.**, Malakhova A.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Modern Genome Editing Technologies in Huntington's Disease Research // J Huntingtons Dis. 2017. V. 6(1). P. 19-31.
5. Малахова А.А., Сорокин М.А., Сорокина А.Е., **Маланханова Т.Б.**, Мазурок Н.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Использование методов редактирования генома для создания изогенных клеточных линий, моделирующих болезнь Хантингтона in vitro // Гены и клетки. 2016. Т. 11. № 2. С. 106-113.

Тезисы докладов:

1. **Маланханова Т.Б.**, Сурумбаева А.К., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Закиян С.М. Использование системы CRISPR/Cas9 для создания и изучения клеточной модели болезни Хантингтона // Сборник научных трудов V Международной конференции «Постгеном'2018». 29 октября-2 ноября 2018 г. Казань, С. 115. Устный доклад
2. **Маланханова Т.Б.**, Сурумбаева А.К., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Закиян С.М. Моделирование болезни Хантингтона с использованием CRISPR/Cas9 // Международный конгресс CRISPR-2018. 10-14 сентября 2018 г, Новосибирск, Материалы международного конгресса CRISPR-2018. С. 43-44. Устный доклад
3. **Tuyana Malankhanova**, Aizhan Surumbayeva, Elena Grigor'eva. Obtaining the medium spiny neurons for the modeling of Huntington's disease in vitro // 6th International Student Congress. 31 мая-2 июня 2018г, Грац, Австрия, ISC Book of Abstracts, С. 156-157. Устный доклад
4. **Malankhanova T.B.**, Malakhova A.A., Pavlova S.V., Medvedev S.P., Zakian S.M. CRISPR/Cas9 in Huntington's disease modeling // CRISPR: From Biology to Biotechnology and Novel Therapeutics. 22-24 октября 2017 г, Ситжес, Испания, Downloadable Abstract Book: Poster Abstracts 1 to 100. С. 79. Стендовый доклад

5. **Malankhanova T.B.**, Malakhova A.A. Generation of iPSC-based model of Huntington's disease using CRISPR/Cas9 technique // 23rd International student congress of (bio)medical sciences. 6-9 июня 2016 г, Гронинген, Нидерланды, Book of abstracts, 23rd International student congress of (bio)medical sciences, С. 386.
Стендовый доклад

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 118 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н. С.М. Закияну за поддержку и помощь при выполнении всех этапов настоящего исследования. Автор искренне благодарит к.б.н. А.А. Малахову и к.б.н. Е.В. Григорьеву за помощь в проведении экспериментов, анализе их результатов, вдохновение и ценные советы на протяжении всей работы. Также автор благодарит к.б.н. А.А. Немудрого и к.б.н. С.П. Медведева за ценные советы в дизайне донорного плазмидного вектора для гомологичной рекомбинации, А.К. Сурумбаеву за помощь в отработке экспериментов по направленной дифференцировке ИПСК, к.б.н. Е.В. Киселеву за советы в характеристике ультраструктурной организации нейронов, к.б.н. В.В. Шерстюка и к.б.н. К.Р. Валетдинову за ценные советы по проведению и анализу количественной ПЦР в реальном времени. Автор благодарен всему коллективу лаборатории за дружеское участие и практическую помощь в работе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезнь Хантингтона

1.1. Общая характеристика

Болезнь Хантингтона, или хорей Хантингтона (БХ) – это наследственное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью нейронов головного мозга. Частота встречаемости БХ – 5-10 на 100000 человек со средним возрастом появления первых симптомов 30-50 лет с последующим прогрессированием в течение 10-25 лет. В случаях ювенильной формы БХ первые симптомы, такие как нарушение поведения и плохая обучаемость, появляются до 20 лет. Симптомами БХ являются непроизвольные хореатические движения, когнитивные и психические нарушения и деменция. В конечном счете смерть пациентов наступает из-за пневмонии, сердечной недостаточности или других осложнений.

БХ, так же, как и другие нейродегенеративные заболевания, характеризуется избирательной гибелью специфического типа нейронов – срединных шипиковых нейронов (СШН) стриатума, а на поздних стадиях дегенерации подвергаются нейроны коры.

1.2. Основы этиопатогенеза

1.2.1. Ген *HTT*

В 1983 году было установлено, что генетическая причина БХ ассоциирована с 4 хромосомой, а через десять лет был определен конкретный ген – *HTT* (*Huntingtin*, локус 4p16.3), мутация в котором приводит к развитию БХ (Bates, 2005). Ген *HTT* состоит из 67 экзонов, и наиболее изученным является 1 экзон, ассоциированный с БХ. В норме в 1 экзоне после первых 17 кодонов следует тракт из 8-35 повторов CAG. Аллели с числом повторов CAG более 36 являются мутантными, при этом аллели с 36-39 CAG-повторами имеют сниженную пенетрантность, 40 CAG и более – полная пенетрантность. Кроме того, число повторов CAG обратно коррелирует с возрастом появления первых симптомов БХ – чем больше повторов, тем раньше проявляются симптомы (Lee et al., 2012).

Нормальный тракт повторов CAG является стабильным, в то время как в мутантных аллелях число повторов может варьировать в сторону увеличения или уменьшения их числа на 70-80% в ряду поколений (Aziz et al., 2011). Такая

межпоколенная нестабильность повторов CAG объясняет генетическую антиципацию, наблюдаемую в семьях с БХ, а также изменения от высоко-нормальных аллелей (27-35 CAG) к мутантным аллелям и переходы от аллелей с неполной пенетрантностью (36-39 CAG) в аллели с полной пенетрантностью (>39 CAG) (Sequeiros et al., 2010).

Исследования межпоколенной нестабильности в семьях с БХ показали, что число повторов CAG имеет высокую тенденцию к увеличению при наследовании от отцов, в то время как наследующиеся от матерей тракты CAG имеют более высокую тенденцию к стабильности или уменьшению (Kremer et al., 1995). Однако, механизмы, лежащие в основе межпоколенной нестабильности, неизвестны.

Несколькими группами исследователей было показано, что удлиненный CAG-тракт также нестабилен в соматических клетках, и число повторов CAG может увеличиваться в течение жизни пациента (Wheeler et al., 1999; Kennedy et al., 2003; Swami et al., 2009). Вариации CAG-повторов в соматических тканях были проанализированы с помощью ПЦР, а уровень соматического мозаицизма был определен с помощью более чувствительного метода Small-Pool ПЦР (Monckton et al., 1995). Этот метод позволяет точно определить вариации числа повторов CAG в каждом удлиненном аллеле в тканях. Так, число повторов CAG варьировало между и внутри разных тканей, при этом наибольшая нестабильность наблюдалась в стриатуме и коре головного мозга, которые демонстрируют наибольшие нейропатологические изменения при БХ. Кроме того, при исследовании большой Венесуэльской когорты с БХ была выявлена положительная корреляция между размером наследуемого аллеля и соматическим мозаицизмом в клетках слизистой оболочки полости рта от пациентов одного возраста. Это наблюдение показывает, что размер наследуемого тракта CAG-повторов является важным модулятором соматической нестабильности. Более того, существуют данные об ассоциации более ранних проявлений БХ с удлинением тракта CAG в клетках коры и стриатума, что подтверждает значительный вклад соматической нестабильности в развитие заболевания (Veitch et al., 2007). Предполагается, что одной из основных причин такой тканеспецифической нестабильности является особенность репарации разрывов ДНК в разных типах клеток (Kovalenko et al., 2012). Кроме того, стоит отметить, что соматическая нестабильность не наблюдалась у плодов на стадии 12-

13 недель. Вероятно, соматическое удлинение тракта повторов происходит на более поздних стадиях развития плода или после рождения в течение жизни пациента (Benitez et al., 1995).

1.2.2. Функции белка хантингтина

Ген *HTT* кодирует белок хантингтин с молекулярным весом 348 кДа (Gutekunst et al., 1995). Наиболее изучена часть белка, содержащая полиглутаминовый тракт, с N-конца от которого расположено 17 аминокислот, а с C-конца – полипролиновый домен. Полиглутаминовый тракт и полипролиновый домен являются полиморфными в человеческой популяции, и до конца не ясно влияние их вариабельности на нормальное функционирование хантингтина.

N-концевые 17 аминокислот формируют α -спираль, которая необходима для «заякоривания» в мембране эндоплазматического ретикулума (Rockabrand et al., 2007). Кроме того, эта спираль служит сигналом ядерного экспорта и подвергается посттрансляционным модификациям: ацетилирование, сумоилирование, убиквитинилирование по 6, 9 и 15 лизину и фосфорилирование по 13 и 16 серину. Все вышеперечисленные модификации влияют на клиренс хантингтина и его локализацию в клетке (Steffan et al., 2004; Atwal et al., 2007; Thompson et al., 2009; Maiuri et al., 2013).

Гибкий полиглутаминовый тракт может принимать несколько конформаций, такие как α -спираль, случайная катушка и петля (Kim et al., 2009). Полипролиновая спираль является относительно жесткой структурой, которая имеет изломанную или прямую конформацию. Полипролиновая спираль стабилизирует полиглутаминовый тракт, а также может влиять на агрегацию мутантного хантингтина.

Остальная часть хантингтина, которая соответствует 66 экзонам, последовательности от 66 до 3144 аминокислоты или 97,8% белка, слабо охарактеризована, поскольку все исследования сосредоточены на 1 экзоне, в котором находится патогенная мутация. Фрагмент между 66 и 3144 аминокислотами содержит несколько HEAT-повторов (формируют антипараллельные α -спирали и являются регионом связывания TOR-комплексов), которые важны для белок-белковых взаимодействий (Palidwor et al., 2009). Такие повторы обнаружены не только в хантингтине, но также и в факторе элонгации 3, протеин фосфатазе 2A и TOR1. HEAT-домены могут служить как соленоидные структуры, которые

выполняют роль скаффолдов для множества белковых комплексов и опосредуют меж- и внутримолекулярные взаимодействия. Средняя часть хантингтина (507-1230 аминокислоты) может связывать N-(1-506 аминокислоты) и C-(2721-3144 аминокислоты) концы, а также самоассоциироваться, формируя гомодимеры хантингтина (Palidwor et al., 2009). Подобным образом N-конец может связываться с C-концевыми участками хантингтина (1725–2800 и 2416–3144 аминокислоты), и эти внутримолекулярные взаимодействия разрушаются при протеолизе (Ochaba et al., 2014; El-Daher et al., 2015). Таким образом, хантингтин может принимать различные пространственные конформации в зависимости от внутримолекулярных взаимодействий (до 100 структурно различимых конформаций) (Seong et al., 2010). Эти взаимодействия могут также включать другие белковые комплексы, поскольку у хантингтина множество белков-партнеров.

Изначально считалось, что ген *HTT* имеет только два мРНК транскрипта размером 10366 пн и 13711 пн (Lin et al., 1993). Второй транскрипт отличается от первого дополнительной последовательностью 3'-UTR, и экспрессия этого транскрипта повышена в мозге. Однако, в 2014 году впервые был обнаружен альтернативный сплайсинг мРНК *HTT*, в результате которого синтезируются варианты хантингтина, в которых могут отсутствовать 10, 12, 29 и 46 экзона или, альтернативно, сохраняться часть 28 интрона размером 57 пн или появляться дополнительный экзон (41b). Хотя эти варианты являются редкими, экспрессия некоторых из них повышается во время развития организма. Отсутствие этих регионов может изменять каноническое белок-белковое взаимодействие хантингтина, регуляцию фосфорилирования и/или подверженность к протеолизу (Hughes et al., 2014; Ruzo et al., 2015).

Транскрипты гена *HTT* и белок хантингтин присутствуют на разном уровне во всех тканях человека (Marques Sousa & Humbert, 2013). Экспрессия *HTT* выше в клетках мозга, чем в других тканях. При этом *HTT* экспрессируется во многих отделах мозга. Так, хантингтин встречается не только в нескольких типах проекционных нейронов и интернейронов стриатума, но и в коре, гиппокампе и мозжечке. Экспрессия *HTT* начинается рано во время эмбрионального развития и сохраняется во взрослой жизни. Однако клинические симптомы БХ появляются только в среднем возрасте.

Хантингтин может подвергаться протеолизу по нескольким сайтам, которые находятся в PEST-регионах (аминокислоты пролин (P), глутаминовая кислота (E), серин (S) и треонин (T)). Сайты для протеолиза присутствуют как в хантингтине дикого типа, так и в мутантном белке (Goldberg et al., 1996). Протеолиз хантингтина дикого типа не наблюдается у «здоровых» людей, поскольку это может приводить к нарушению некоторых функций белка (El-Daher et al., 2015). Протеолиз может происходить при патологических условиях, которые могут быть не связаны с БХ, например, когда происходит гибель большого числа клеток, при активации каспаз или при апоптозе во время эмбрионального развития. Множество протеолитических сайтов в хантингтине предполагает, что различные расщепления вызывают разные физиологические реакции в зависимости от скоординированных протеолитических событий. Например, расщепление хантингтина одновременно по 586 и 552 аминокислотам генерирует фрагмент 553–586, который после присоединения миристиновой кислоты стимулирует образование аутофагосом (Martin et al., 2014).

Хантингтин участвует во множестве различных клеточных процессов. Так, хантингтин в комплексе с белками HAP1, кинезин-1 и динактином контролирует транспорт органелл в anterogradном и retrogradном направлениях в аксонах и дендритах нейронов (Engelender et al., 1997; Gauthier et al., 2004; Caviston et al., 2007; Colin et al., 2008; Twelvetrees et al., 2010). С помощью хантингтина транспортируются везикулы с нейромедиаторами, аутофагосомы, эндосомы, лизосомы, везикулы, содержащие нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), предшественники бета-амилоида (amyloid precursor protein, APP) и рецепторы ГАМК.

Еще одна важная функция хантингтина – участие в клеточном делении. Экспрессия *Htt* повышена в делящихся клетках, и белок хантингтин локализуется у полярных телец и веретена деления, а также у астральных микротрубочек. В течение митоза хантингтин связан с полярными тельцами через белок динеин, что способствует аккумуляции белков NUMA и LGN, которые направляют движение митотического веретена (Gutekunst et al., 1995; Godin et al., 2010; Elias et al., 2014). Таким образом, нарушение правильного функционирования хантингтина может приводить к дезориентации веретена деления во время митоза.

Хантингтин в основном присутствует в цитоплазме, но также представлен и в ядре, поскольку он связывает транскрипционные факторы и регуляторы, транспортирует их в ядро, а также участвует в регуляции транскрипции как посредник. Полиглутаминовый тракт хантингтина в качестве скаффолда связывает множество транскрипционных факторов, включая CREB-связывающий белок (CREB-binding protein, CBP), p53 (Steffan et al., 2000), NeuroD (Marcora et al., 2003), SP-1 (Dunah et al., 2002) и NF- κ B (Takano & Gusella, 2002). Хантингтин также взаимодействует с активаторами и репрессорами транскрипции и связывает ядерные рецепторы (Yohrling et al., 2003; Zuccato et al., 2003; Futter et al., 2009). Через эти взаимодействия хантингтин может усиливать транскрипционные факторы и ингибировать или активировать репрессоры транскрипции, тем самым способствуя повышению или подавлению экспрессии генов. Например, p53 взаимодействует с хантингтином, и, следовательно, хантингтин потенциально влияет на целевые гены p53, которые вовлечены в контроль клеточного цикла, процессов апоптоза, клеточного стресса и репарации ДНК.

В дополнение, хантингтин участвует также в ремоделировании хроматина, цилиогенезе, эндоцитозе, аутофагии и митофагии (Seong et al., 2010; Martin et al., 2014; El-Daher et al., 2015; Haremakei et al., 2015).

1.2.3. Токсическое влияние мутантного хантингтина

При БХ увеличивается протеолиз хантингтина в клетках мозга пациентов, что приводит к потере нормального функционирования белка и нарушению тех клеточных процессов, в которых он принимал участие. В результате гидролиза образуются токсичные N-концевые фрагменты хантингтина, содержащие полиглутаминовый (polyQ) тракт, которые нарушают множество клеточных процессов в цитоплазме. Кроме того, эти фрагменты транспортируются в ядро, где они нарушают процессы транскрипции (Benn et al., 2005; Graham et al., 2006). Мутантный хантингтин также формирует агрегаты, которые первоначально считались токсическими включениями при БХ (Davies et al., 1997). Однако, существует предположение, что формирование этих включений является стратегией защиты от токсической растворимой формы хантингтина (Miller et al., 2010). Токсичность агрегатов может зависеть от стадии заболевания и их субклеточной локализации.

Чем короче фрагменты хантингтина, содержащие polyQ, тем они более токсичны, и могут действовать через механизм «gain-of-function» (Ross & Tabrizi, 2011). Более того, С-концевые фрагменты, не содержащие polyQ и образующиеся при протеолизе как нормального, так и мутантного хантингтина, также являются токсичными (El-Daher et al., 2015).

Таким образом, протеолиз хантингтина приводит не только к нарушению функционирования самого белка, но и к образованию фрагментов, которые нарушают процессы транскрипции, аутофагии и многие другие. Так, мутантный хантингтин вызывает нарушения митохондрий, кальциевого сигналинга, изменение эндоцитоза, микротрубочкового транспорта, ухудшение синаптической активности и эксайтотоксичность, вызванную увеличением высвобождения глутамата.

Ген *HTT* экспрессируется во многих тканях организма, однако наибольшему токсическому эффекту мутантного хантингтина подвержены срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума (Morigaki & Goto, 2017).

1.2.4. Избирательная гибель срединных шипиковых нейронов стриатума при БХ

Функции нейронов стриатума

Стриатум является самой крупной структурой базальных ганглиев – набора взаимосвязанных ядер серого вещества, расположенных глубоко в переднем мозге. В стриатум поступают сигналы от дофаминергических нейронов среднего мозга и глутаматергических нейронов новой коры и таламуса. Далее из стриатума сигналы направляются через ГАМК-ергические нейроны в бледный шар и черную субстанцию (Рисунок 1) (Roze et al., 2011). Стриатум играет важную роль в обработке информации, связанной с двигательной функцией, обучением, принятием и поиском решений, механизмами системы поощрения и т.д.

СШН имеют на поверхности дендритов около 10000-15000 шипиков, с которыми образуют синаптические контакты аксональные расширения нейронов, «входящие» в стриатум. При этом каждый входящий аксон формирует синаптические контакты со многими СШН, и каждый СШН получает огромное количество сигналов (от 5 до 10 тысяч) от разных входящих аксонов. Таким образом, формируется широкая конвергенция кортикальных глутаматергических входов,

которые оказывают возбуждающий эффект на тормозные ГАМК-ергические СШН (Рисунок 1) (Doig et al., 2010).

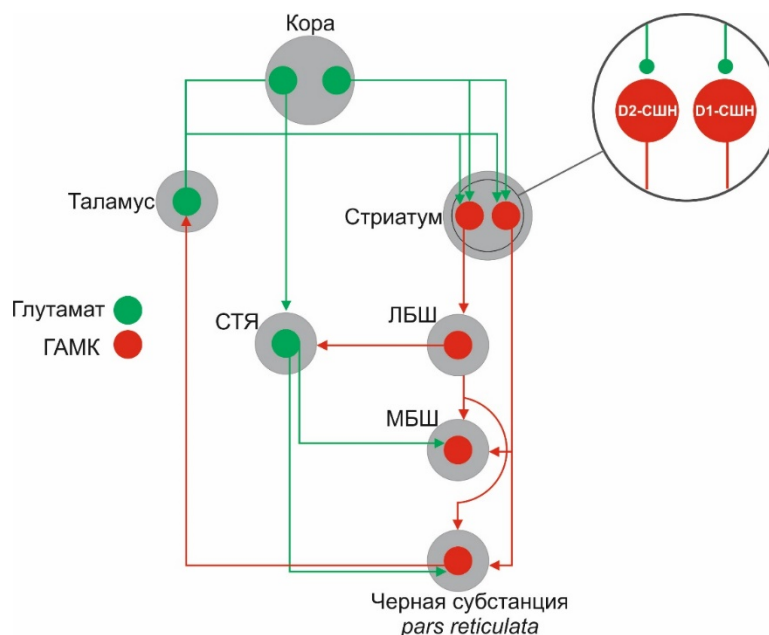


Рисунок 1. Схема возбудящих и тормозных влияний между базальными ядрами и корой, ЛБШ – латеральный бледный шар, МБШ – медиальный бледный шар, СТЯ – субталамическое ядро (Kravitz et al., 2015).

СШН (10-24 мкм в диаметре) составляют примерно 95% популяции нейронов стриатума (Yager et al., 2015). СШН принимают возбуждающие глутаматергические входы из новой коры (III и V слои) и таламуса и далее направляют тормозные ГАМК-ергические эфференты в целевые отделы мозга (Рисунок 1). Примерно половина СШН, которые экспрессируют дофаминовый D1-рецептор, проецирует сигнал через прямой путь к нейронам внутренней части бледного шара (медиальный бледный шар) и *pars reticulata* черной субстанции. Остальные СШН, экспрессирующие дофаминовый D2-рецептор, дают проекции через непрямой путь к нейронам внешней части бледного шара (латеральный бледный шар) (Surmeier et al., 2007). Баланс между этими двумя путями является центральным для функции выбора действия базальных ганглиев.

Остальные 5% нейронов стриатума составляют нешипиковые интернейроны, которые классифицируются по их морфологии, белковому составу и электрофизиологическим свойствам на большие холинергические интернейроны и соматостатин-, парвальбумин- и кальретинин-экспрессирующие ГАМК-ергические

интернейроны (Kawaguchi et al., 1995), которые регулируют возбудимость СШН. Синаптические контакты между конкретным ГАМК-ергическим интернейроном и СШН располагаются ближе к телу нейрона, и таким образом, интернейроны могут быстро влиять на поступающие сигналы от дендритов к соме и регулировать генерацию потенциала действия.

Токсическому воздействию мутантного хантингтина наиболее подвержены СШН и парвальбумин-содержащие интернейроны стриатума, хотя в этих клетках экспрессия *HTT* ниже по сравнению с другими клетками мозга. Количество хантингтина и его мРНК в функционально-активных стриарных нейронах не изменено. Это говорит о том, что изменение экспрессии хантингтина не ассоциировано с гибелью клеток стриатума. Более того, сверхэкспрессия мутантного *HTT* может приводить к функциональным нарушениям и в других отделах мозга, таким образом, чувствительность СШН не является специфичной к мутантному хантингтину (Reiner & Deng, 2018).

Эксайтотоксичность

Предполагается, что при БХ основной причиной повышенной чувствительности СШН является эксайтотоксичность. Этот патологический процесс возникает вследствие чрезмерной глутаматергической передачи сигналов и изменения внутриклеточного уровня кальция, что приводит к нарушению митохондриального энергообразования и гибели клеток. Повышенное высвобождение глутамата происходит на ранних стадиях БХ с последующей потерей глутаматергических терминалей на симптоматической стадии БХ и «разобщением» коры и стриатума (Raymond et al., 2011). Повышенная передача сигналов глутамата также может происходить из-за более высокой концентрации внеклеточного глутамата в результате пониженного обратного захвата нейромедиатора. В кортикостриарных синапсах глутамат удаляется из внеклеточного пространства астроцитами, которые экспрессируют транспортеры глутамата (glutamate-transporters, GLT). Так, снижение уровня мРНК и белка GLT1 с соответствующим снижением поглощения глутамата наблюдалось у грызунов с симптоматическими проявлениями БХ (Estrada-Sánchez & Rebec, 2012; Miller et al., 2012). Увеличение экспрессии GLT-1 способствовало увеличению захвата глутамата и улучшению поведенческих симптомов у мышей. Эти результаты показали влияние

GLT-1 на повышенную передачу сигналов глутамата и, соответственно, могут быть разработаны терапевтические средства, которые усилят поглощение глутамата, для лечения ранних стадий БХ.

Увеличение уровня внеклеточного глутамата усиливает передачу сигналов на рецепторах СШН. Постсинаптические рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) на СШН обеспечивают кратковременный вход катионов в клетку и деполяризацию мембраны. После деполяризации мембраны активизируются NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) за счет удаления ионов Mg^{2+} , которые блокируют этот рецептор в отсутствие деполяризации. Такой механизм активации NMDAR позволяет этим рецепторам обеспечивать синаптическую пластичность в зависимости от активности. Сверхактивация NMDAR делает нейроны восприимчивыми к эксайтотоксичности из-за высокой проницаемости Ca^{2+} и медленной дезактивации, что приводит к внутриклеточной перегрузке ионами кальция. Кроме того, такая селективная потеря стриарных СШН наблюдается у грызунов после инъекции селективного агониста NMDAR, хинолиновой кислоты (Beal et al., 1986). Все это позволяет предположить, что именно нарушенная передача сигналов NMDAR является основным механизмом селективной нейродегенерации при БХ.

NMDAR формируют гетеротетрамеры из NR1 и NR2A-D субъединиц. NR1 субъединица необходима для функционирования NMDAR, а NR2 субъединицы отвечают за избирательную проницаемость канала, время дезактивации, чувствительность к агонистам и антагонистам и взаимодействие с сигнальными белками (Li et al., 2004).

NR2B-субъединицы высоко экспрессируются в СШН стриатума, и известно, что мутантный хантингтин селективно повышает ионные токи и эксайтотоксичность, связываясь с NMDAR, содержащими NR2B-субъединицы (Chen et al., 1999). Таким образом, специфическая повышенная экспрессия NR2B по сравнению с другими субъединицами NR2 может оказывать дифференциальную чувствительность именно СШН стриатума. Так, например, отделы мозга, не повреждающиеся при БХ, такие как мозжечок и ствол мозга, имеют низкий уровень экспрессии NR2B (Hollmann & Heinemann, 1994).

Кальциевый гомеостаз

При БХ также повышается экспрессия кальций-связывающих белков парвальбумина и кальренина, которые позитивно ассоциированы с выживаемостью интернейронов. Парвальбумин и кальренин оказывают буферный эффект в ответ на эксайтотоксичность, индуцированную повышенным уровнем ионов кальция, и, таким образом, оказывают нейропротекторный эффект в интернейронах. Однако, парвальбумин-содержащие интернейроны также имеют повышенный уровень экспрессии кальций-проницаемых AMPA-рецепторов, что в итоге приводит к их избирательной чувствительности к эксайтотоксическому эффекту при БХ (Morigaki & Goto, 2017).

Окислительный стресс

При постмортальном исследовании мозга пациентов с БХ была обнаружена сниженная активность комплексов II, III и IV митохондриальной дыхательной цепи (Gu et al., 1996). Сохраняя гиперполяризованное состояние, требующее большого количества энергии (вследствие постоянной активности Na^+/K^+ -АТФ-азы), стриарные СШН обычно электрофизиологически неактивны (Wilson & Kawaguchi, 1996). Уникальная потребность СШН в большом количестве энергии может быть причиной их повышенной чувствительности к нарушению функционирования митохондрий. Стоит отметить, например, что холинергические интернейроны обогащены ферментами-антиоксидантами SOD1 и SOD2, в то время как СШН имеют низкий уровень экспрессии этих ферментов. Хотя окислительный стресс, возникающий при нарушении функций митохондрий, редко наблюдается на ранних стадиях развития БХ, он может быть главным механизмом нейродегенерации на более поздних стадиях (Morigaki & Goto, 2017). Каким образом мутантный хантингтин оказывает негативное влияние на митохондрии достоверно неизвестно, хотя исследования *in vitro* показали, что полиглутаминовые агрегаты напрямую нарушают работу митохондрий во время переменного кальциевого тока (Panov et al., 2003). Мутантный хантингтин увеличивает вход ионов кальция в митохондрии, приводя к апоптозу и уменьшению синтеза АТФ. Более того, показано, что мутантный хантингтин ассоциируется с внешней мембраной митохондрий, индуцирует открытие митохондриальных проницаемых временных пор, которые важны в буферировании ионов кальция и высвобождении цитохрома *c* (Choo et al., 2004). Также существует предположение, что мутантный белок влияет на регуляцию

транскрипции специфических генов, кодирующих митохондриальные белки метаболизма, снижение экспрессии которых наблюдали в мышечных моделях БХ (Luthi-Carter et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2002).

1.3. Лабораторная диагностика и симптоматическое лечение БХ

1.3.1. Молекулярно-генетическая диагностика БХ

Капиллярный электрофорез флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР является наиболее распространенным методом для определения числа повторов СAG в гене *HTT*. Простота использования и невысокая стоимость такого анализа позволяют в короткое время детектировать до 100 повторов СAG (Jama et al., 2013).

Для точного определения числа повторов необходимо тщательно исследовать последовательности, фланкирующие тракт повторов. Рядом с СAG-повторами через 12 пар оснований имеется еще один участок с повторами, содержащий тринуклеотиды ССG. Исходно, для оценки числа повторов СAG использовали праймеры, фланкирующие как СAG, так и ССG-повторы. Число повторов СAG определялось исходя из предположения, что число повторов ССG неизменно и составляет 7 триплетов. Позже было показано, что повторы ССG также полиморфны, но стабильны и не патогенны (Andrew et al., 1994). Число ССG может варьировать от 4 до 12 повторов, причем 7 и 10 повторов являются наиболее часто встречающимися полиморфизмами (Pramanik et al., 2000). Поэтому для того, чтобы избежать неточности диагностики, пара праймеров для ПЦР должна фланкировать только тракт повторов СAG.

Сейчас используют капиллярный электрофорез для оценки размера продуктов ПЦР. При этом контрольные образцы должны содержать известное число повторов, поскольку продукты с удлиненными трактами повторов могут иметь измененную электрофоретическую подвижность по сравнению со стандартными маркерами. Однако даже с помощью «идеальных» контролей невозможно со 100%-ной точностью определить число повторов, и размер ошибки составляет обычно ± 1 триплет. Для более длинных трактов определение точного числа повторов более затруднительно, хотя эта неточность приводит к незначительным клиническим последствиям. Другой причиной неточности определения длины повторов является наличие нескольких полос (на гелях) или пиков (автоматическое генотипирование) аллелей с удлиненным трактом вместо одиночных полос или пиков. Причиной этого

является либо артефакт ПЦР, либо мозаицизм лимфоцитов. В стандартной практике учитывают наиболее ярко выраженные пик или полосу. Кроме того, в лабораториях часто тестируют несколько членов семьи, особенно при пресимптоматической диагностике, для прямого сравнения длины аллелей (Bastepe & Xin, 2015).

1.3.2. Терапия БХ

Разрушение СШН стриатума, оказывающих тормозное воздействие на дофаминергические нейроны, вызывает соответствующую гиперактивацию черной субстанции и высвобождение избыточного количества дофамина. Это в свою очередь приводит к появлению хорей – основного моторного симптома БХ. Традиционно для лечения хорей врачи использовали блокаторы дофаминовых рецепторов – галоперидол и респиредон, однако их применение приводило к серьезным побочным эффектам, таким как увеличение веса, метаболический синдром, сонливость, паркинсонизм и поздняя дискинезия (Barr et al., 1988; Sankurtaran et al., 2006).

Исследователями и врачами также было опробовано множество препаратов, такие как дофамин-разрушающие агенты, дофаминовые антагонисты, бензодиазепины, антагонисты глутамата, каннабиноиды и литий. Кроме того, хирургические процедуры – глубокая стимуляция мозга и трансплантация фетальных клеток – также были использованы для лечения БХ (Bagchi et al., 1983; Paleacu et al., 2007; Armstrong et al., 2012; Pidgeon & Rickards, 2013). Фармакологические препараты при этом обычно снимали только моторные симптомы БХ – хорей, дистония, баллизм, миоклонус и тики. Однако особое внимание стоит также уделять на положительные и побочные эффекты, которые может оказать вещество на психические проявления БХ, такие как повышенная возбудимость, депрессия, тревожность, мании, апатия, обсессивно-компульсивное расстройство и снижение когнитивных способностей.

Тетрабеназин – первое лекарство от БХ, одобренное организацией FDA (Food and Drug Administration). Тетрабеназин ингибирует центральный везикулярный транспортер моноаминов 2 типа путем обратимого связывания, тем самым селективно снижает уровень дофамина (Pettibone et al., 1984). Кроме того, тетрабеназин имеет высокую специфичность к структурам мозга, наиболее подверженным нарушениям при БХ (Thibaut et al., 1995). Побочными эффектами при

приеме тетрабеназина являются акатизия («неусидчивость»), депрессия, головокружение, утомляемость или паркинсонизм.

Еще одно лекарство от хорей было недавно одобрено FDA – деутетрабеназин, который отличается от тетрабеназина тем, что содержит в ключевых точках молекулы дейтерия вместо водорода. Такая модификация делает связь углерод-дейтерий более прочной по сравнению с углерод-водородом, и соответственно увеличивает период полувыведения вещества из плазмы и снижает риск побочных эффектов, особенно седативный эффект (Frank et al., 2016).

Лечение когнитивных и психических симптомов БХ также является не менее важной задачей. Сейчас используют все классы лекарств от депрессии, такие как селективные ингибиторы обратного захвата серотонина или трициклические антидепрессанты. Также используются стабилизаторы настроения, такие как ламотриджин, вальпроат или карбамазепин, которые могут быть эффективными для снятия раздражительности и агрессивности. Поведенческая модификация, консультирование и другие интервенции, не связанные с применением лекарственных препаратов, также могут быть эффективными, особенно на ранних стадиях развития БХ (Frank et al., 2014).

Все вышеперечисленные препараты снимают только симптомы заболевания, и не существует способов устранения самой причины БХ. Однако, моногенная природа БХ делает возможной разработку терапевтических средств, нацеленных на основной патогенный фактор, а именно – мутантный ген *HTT*. Воздействие на транскрипцию мутантного *HTT* и трансляцию его мРНК являются в настоящее время областью интенсивного исследования. Перспективной стратегией снижения уровня экспрессии мутантного *HTT* являются антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) (Wild & Tabrizi, 2017). В настоящее время в клинических испытаниях на людях используют интратекально введенные АСО, нацеленные на общий хантингтин (NCT02519036). Кроме того, начались первые клинические испытания АСО, нацеленных специфически на мРНК мутантного аллеля *HTT* (NCT03225833). Другими многообещающими стратегиями являются РНК-интерференция и репрессоры транскрипции на основе цинковых пальцев и CRISPR/Cas9.

1.4. Основные модели БХ в системе *in vivo*

До выявления мутации, лежащей в основе БХ, модели этого заболевания получали путем разрушения стриатума с помощью нейротоксинов (McGeer et al., 1976; Schwarcz et al., 1984; Beal et al., 1986). Основанием для создания таких моделей было наблюдение, что в первую очередь нейродегенерации подвержен стриатум. Так, инъекции токсических агонистов рецепторов глутамата в стриатум приводили к избирательной гибели ГАМК-ергических проекционных нейронов, которые подвергаются наибольшему поражению при БХ. Первые модели БХ были получены с использованием иботениновой и каининовой кислот. Затем, эти соединения были заменены на хинолиновую кислоту, поскольку ее токсическое влияние не затрагивало стриарные интернейроны, которые в меньшей степени подвержены патологическому влиянию при БХ (Beal et al., 1991). В дополнение к агонистам глутамата использовали системное введение митохондриальных токсинов – малонат и 3-нитропропионовую кислоту (3-NPA) (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1993). Эти токсины приводили к снижению продукции АТФ клетками за счет нарушения цепи переноса электронов, и при хроническом введении токсинов наблюдалось преимущественное поражение клеток стриатума. Такими способами были получены модели БХ на мышах и приматах. Главным недостатком моделей с химически-индуцированным поражением стриатума является острый характер поражений, который появляется в течение нескольких дней. Такой исход событий резко контрастирует с медленными патологическими процессами при БХ, которые могут протекать десятилетиями, прежде чем начнут проявляться первые симптомы. Таким образом, прогрессирующие, возраст-зависимые патологические события не могут быть представлены на таких моделях БХ. Более того, хотя атрофия стриатума является важнейшей нейропатологической особенностью БХ, необходимо учитывать влияние мутантного *HTT*, который экспрессируется в ЦНС и периферических тканях. Экспрессия мутантного *HTT* в разных тканях всего организма может вносить вклад в основные патологические особенности заболевания. Таким образом, появилась необходимость в создании генетических моделей животных.

БХ вызвана доминантной мутацией в одном конкретном гене. Однако, особенности гена *HTT* и природа мутации делают задачу создания генетической

модели БХ довольно трудоемкой. Множество подходов было разработано для создания генетических моделей БХ, ключевые отличительные особенности которых следующие: использование полноразмерного *HTT* или фрагмента гена *HTT*; число CAG-повторов в генетической конструкции; использование кодирующей части, содержащей только повторы CAG или дополнительно один или более САА-кодон (тоже кодирует глутамин); экспрессия мутантного *HTT* с трансгена или введение удлиненного тракта повторов в эндогенный локус *Htt*; использование гена *HTT* человека или эндогенного гена животного; использование кДНК или геномной ДНК, содержащей все интроны и регуляторные последовательности; и, наконец, использование промотора гена *HTT* или другого промотора для экспрессии мутантного белка (Рисунок 2). Итак, далее будут рассмотрены основные генетические модели БХ на животных.

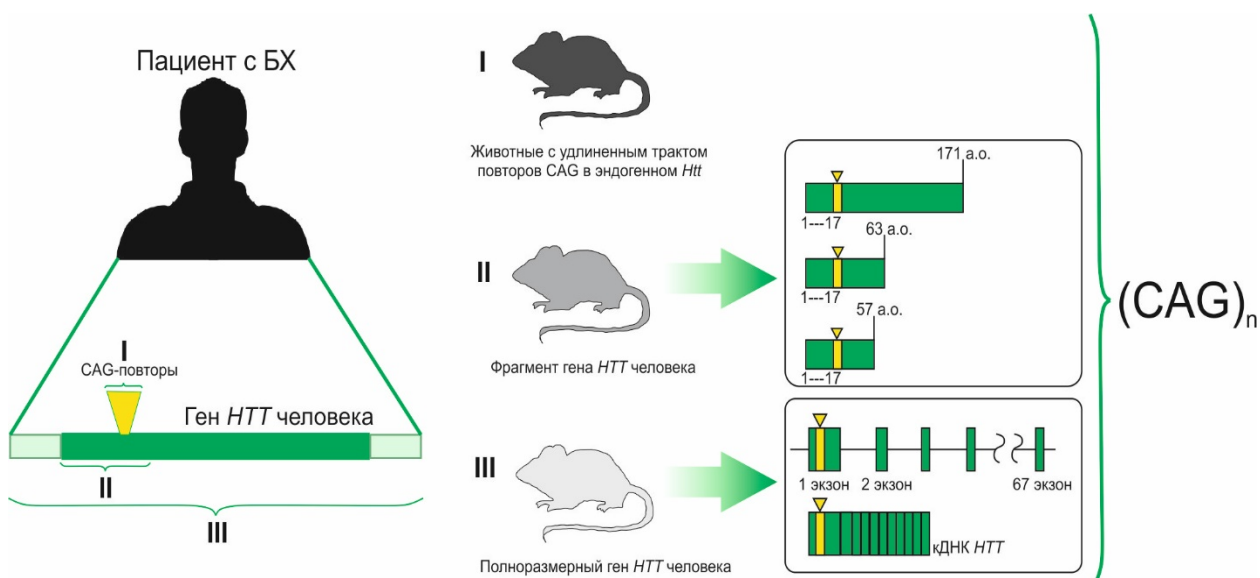


Рисунок 2. Генетические модели БХ.

***Caenorabditis elegans*.** Трансгенные модели БХ на основе *C. elegans* экспрессируют укороченный N-концевой фрагмент мутантного хантингтина разного размера от 57 до 171 аминокислот в нейронах. Несмотря на отсутствие ортолога *HTT* у *C. elegans*, экспрессия трансгенного *HTT* у червей вызывает возраст-зависимые дефекты механосенсоров, нейрональную дисфункцию и, на фоне сенсбилизации, нейродегенерацию (Faber et al., 1999; Parker et al., 2001).

***Drosophila melanogaster*.** Практически все модели БХ на основе *D. melanogaster* имеют индуцируемую экспрессию полноразмерного или укороченного

N-концевого фрагмента мутантного хантингтина в целевой популяции клеток (Steffan et al., 2001; Lee et al., 2004; Miller et al., 2010). Эти модели демонстрируют прогрессирующий дегенеративный фенотип, двигательные дисфункции и сниженную выживаемость.

Грызуны, безусловно, являются наиболее часто используемыми животными при моделировании БХ, и насчитывается более 20 различных моделей. Мыши линий R6/1, R6/2 и N171-Q82 (далее обозначены как N171) экспрессируют укороченные N-концевые фрагменты мутантного хантингтина. Линии R6/1 и R6/2 экспрессируют 1 экзон человека, содержащий 116 и 144 повтора CAG соответственно, под управлением промотора *HTT* человека (Mangiarini et al., 1996). Мыши линии N171 экспрессируют укороченную последовательность кДНК *HTT* с 82 повторами CAG под контролем промотора гена прионного белка мыши (Schilling et al., 1999). У всех трех линий мышей, экспрессирующих укороченный фрагмент *HTT*, достаточно быстро появляются двигательные, когнитивные и поведенческие нарушения, потеря веса и уменьшение продолжительности жизни, свойственные БХ, сопровождающиеся генерализованным дегенеративным фенотипом.

Мыши, геном которых содержит полноразмерный мутантный хантингтин, создают путем внесения 1 экзона человека с удлиненным трактом повторов CAG в эндогенный локус *Htt* или внесением полноразмерного мутантного гена *HTT* человека с помощью трансгена. С помощью первого способа получены линии мышей HdhQ111, CAG140 и HdhQ150 (Lin et al., 2001; Wheeler et al., 2002; Menalled et al., 2003). Эти модели являются генетически «точными», несут одну или две копии мутантного гена с естественным уровнем экспрессии мутантного хантингтина и демонстрируют фенотип БХ (Lerner et al., 2012).

Для внесения полноразмерного мутантного гена *HTT* человека в геном мыши использовали технологии искусственных хромосом дрожжей (yeast artificial chromosome, YAC) и бактерий (bacterial artificial chromosome, BAC). Такие мыши линий YAC128 (128 CAG) и BACHD (97 CAG) экспрессируют мутантный *HTT* человека, включающий все экзоны, интроны и регуляторные последовательности, в сумме составляющие более 130 т.п.н., и обеспечивающие временную и тканеспецифическую экспрессию трансгена (Slow et al., 2003; Gray et al., 2008).

Модели на основе крупных животных. До 2008 года было всего несколько работ с использованием приматов как модели БХ с химически разрушенным стриатумом, и не было исследований с использованием кошек, собак и других домашних животных как экспериментальных моделей БХ. Интерес к крупным животным моделям БХ возрос после публикаций о трех трансгенных моделях на основе макак-резус (*Macaca mulatta*) (Yang et al., 2008), овец (*Ovis aries*) (Jacobsen et al., 2010) и карликовых домашних свиней (Ваха et al., 2013). Хотя все три модели называют первыми «крупными» моделями БХ, ни одну из них нельзя использовать как модель БХ, поскольку не были представлены прямые доказательства того, что они демонстрируют патологический фенотип заболевания (Pouladi et al., 2013).

В 2018 году с помощью методов геномного редактирования и технологии пересадки ядра соматической клетки были получены свињи с эндогенной экспрессией полноразмерного мутантного *HTT* (Yan et al., 2018). Свињи имели моторные и поведенческие нарушения и раннюю смертность, которые сохранялись в ряду поколений. Более того, в мозге этих животных наблюдалась селективная гибель СШН стриатума. Таким образом, эта модель БХ на основе свиней впервые демонстрировала явную и избирательную нейродегенерацию, наблюдаемую у пациентов с БХ.

Модельные организмы позволили исследователям изучать прогрессирование БХ в системе *in vivo* и способствовали более точному пониманию механизмов развития заболевания. Однако при изучении неврологических расстройств такие модели ограничены значительными фундаментальными различиями с человеком. Кроме того, часто модельные животные не полностью воспроизводят нейрональный фенотип человека.

2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека как основа для создания клеточных моделей БХ

Модели наследственных заболеваний на основе культивируемых клеток человека являются наиболее релевантной альтернативой модельных организмов. Так, эти клетки могут быть получены от конкретного пациента с наследственным заболеванием, например, БХ. При этом фенотип заболевания может проявляться на клеточном уровне. Безусловно, «моделирование» болезни в чашке Петри не может адекватно отражать сложные патологические процессы, происходящие на уровне

целого организма. Однако, сейчас ведутся активные работы по культивированию клеток в виде 3D-органовидов и сокультивированию различных типов клеток, чтобы в некоторой степени приблизить модели *in vitro* к процессам, протекающим *in vivo*.

Изначально исследователи использовали первичные культуры клеток или перевиваемые трансформированные линии. Однако недостатком первых клеток была ограниченная доступность материала, а недостаток вторых – измененный геном. Разработка технологии получения плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека открыла новые возможности для биомедицинских и трансляционных исследований БХ. Одним из отличительных свойств ПСК является самообновление, позволяющее бесконечно делиться с сохранением исходных свойств. Второе свойство – это плюрипотентность, способность дифференцироваться в различные типы клеток, в том числе нейрональные, что является важным параметром для изучения нейродегенерации при БХ (Marchetto et al., 2010; Lunn et al., 2011).

Эмбриональные плюрипотентные стволовые клетки (ЭСК) человека получают из клеток внутренней клеточной массы бластоцисты (эмбриобласт), и ЭСК потенциально могут дифференцироваться в любой тип клеток человеческого организма (Thomson et al., 1998). Поскольку процедура изоляции внутренней клеточной массы разрушает бластоцисту, при использовании ЭСК человека возникают этические проблемы, и такие исследования сталкиваются с юридическими ограничениями.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека так же, как и ЭСК, обладают свойствами самообновления и плюрипотентности. Однако, для получения ИПСК используют дифференцированные клетки взрослого организма, что позволяет избежать те этические проблемы, с которыми столкнулось использование ЭСК. Первые ИПСК были получены из фибробластов мыши в 2006 году с помощью ретровирусных векторов, сверхэкспрессирующих четыре транскрипционных фактора – *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* (Takahashi & Yamanaka, 2006). Далее, подобным образом были получены ИПСК человека путем сверхэкспрессии *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC* и *KLF4* с помощью ретровирусной трансдукции (Takahashi et al., 2007) и сверхэкспрессии *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28* с помощью лентивирусной системы (Yu et al., 2007).

Вирусные векторы для репрограммирования клеток интегрируются в геном, и тем самым ассоциированы с риском инсерционного мутагенеза. Ввиду этой проблемы исследователи разработали новые подходы для получения ИПСК, «свободных» от трансгенов. Так, были разработаны методики получения ИПСК с помощью трансфекции эписомными векторами (Yu et al., 2009), векторами на основе вируса Сендай (Fusaki et al., 2009) и синтетической модифицированной мРНК (Warren et al., 2010).

Первые пациент-специфичные ИПСК, несущие 72 повтора *CAG* в гене *HTT*, были получены в 2008 году с помощью ретровирусных векторов, экспрессирующих факторы плюрипотентности (Park et al., 2008), и на данный момент уже получено большое число линий ИПСК от пациентов с БХ с разным числом повторов *CAG* (Таблица 1).

Таблица 1. Модели БХ на основе пациент-специфичных ИПСК.

ИПСК от пациентов с БХ		
Число повторов <i>CAG</i>	Фенотип, особенности экспрессии генов в ИПСК и дифференцированных производных	Ссылка
72	Фенотип не описан	(Park et al., 2008)
72	Повышенная активность каспаз в отсутствие факторов роста у нейрональных производных	(Zhang et al., 2010)
50, 109	Повышенное число вакуолей в дифференцированных астроцитах	(Juopperi et al., 2012)
15/17, 15/18,17/45, 39/43, 42/44	Нет различий в скорости роста, эффективности дифференцировки, активации каспаз в ИПСК. Повышенные лизосомальная активность и формирование аутофагосом	(Camnasio et al., 2012)
72	Дисрегуляция белков, вовлеченных в окислительный стресс и апоптоз, в ИПСК. Низкая эффективность нейрональной дифференцировки и повышенный апоптоз нейронов. Сниженный уровень белков,	(Chae et al., 2012)

72	ассоциированных с цитоскелетом, в нейронах На стадии нейрональных предшественников повышенные апоптоз, активность каспаз, снижена экспрессия BDNF, максимальное потребление кислорода, изменены сигнальные каскады TGF-β и кадгерина. Нейрональные предшественники с исправленной мутацией в гене <i>HTT</i> имели нормальный фенотип	(An et al., 2012)
17/21, 21/28, 18/33, 18/60, 19/109, 18/180	Изменен паттерн экспрессии генов в дифференцированных нейрональных предшественниках, снижены энергетический метаболизм, адгезия клеток. Повышенная гибель нейронов при длительном культивировании, недостатке BDNF или окислительном стрессе (H ₂ O ₂ или 3-MA). Добавление глутамата приводило к повышению числа нейронов с нарушенным гомеостазом кальция	(The HD iPSC Consortium, 2012)
72	Мутантный хантингтин формировал EM48-позитивные агрегаты в дифференцированных нейронах. При активации микроРНК miR-196a число таких агрегатов уменьшалось	(Cheng et al., 2013)
18/21, 18/28, 18/33, 18/60, 19/109, 18/180	Недостаток BDNF приводил к повышенному апоптозу нейронов	(Mattis et al., 2015)
71, 109	Дисрегуляция MAPK и WNT сигнальных путей и экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом (<i>SOD1</i>) и апоптозом (p53)	(Szlachcic et al., 2015)
43	DARPP32-позитивные ГАМК-ергические нейроны, экспрессирующие A _{2A} R подобно СШН стриатума. Повышенная чувствительность к повреждениям ДНК. Стимуляция A _{2A} R снижала апоптоз от	(Chiu et al., 2015)

35, 57, 58, 70, 180	повреждений и окислительного стресса через сАМР/РКА-зависимый путь ИПСК имели геномные аномалии, статистически значимую повышенную геномную нестабильность при репрограммировании, ассоциированную с числом повторов СAG. ИПСК от пациентов с БХ с нормальным кариотипом имели повышенный АТМ-p53 сигналинг (повышенные уровни фосфорилированного p53 и H2AX)	(Tidball et al., 2016)
40/17, 47/16, 42/27	Нейроны воспроизводили фенотип заболевания <i>in vitro</i> (агрегация мутантного хантингина, повышенное число лизосом/аутофагосом, ядерных углублений и гибель нейронов при старении клеток). Детектировались токи через депорегулируемые Ca ²⁺ -каналы и повышенный вход кальция в дифференцированных нейронах	(Nekrasov et al., 2016)

Фенотип БХ обычно не наблюдается в ПСК (Jeon et al., 2012) . Однако, в некоторых исследованиях были показаны значительные изменения молекулярных процессов, клеточной выживаемости и скорости пролиферации. При изучении сигнальных каскадов и процессов, вовлеченных в патогенез БХ, в ИПСК от пациентов со взрослой и ювенильной формой заболевания наблюдалось нарушение регуляции MAPK и WNT сигнальных путей, нарушение экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом, в частности, *SOD1*. Более того, была нарушена экспрессия *TP53*, белковый продукт которого взаимодействует и с хантингином, и с белками вышеуказанных каскадов (Szlachcic et al., 2015). Все это указывает на то, что молекулярные процессы, нарушающиеся при БХ, могут быть уже изменены в недифференцированных плюрипотентных клетках, и патогенез БХ может начаться на ранних этапах жизни человека.

2.1. Направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в срединные шипиковые нейроны

Многими исследователями показано, что признаки БХ чаще всего начинают проявляться в дифференцированных производных ИПСК, таких как мультипотентные клетки-предшественники (нейрональные стволовые клетки, НСК) (The HD iPSC Consortium, 2012) и ГАМК-ергические СШН (Chiu et al., 2015; Nekrasov et al., 2016). Таким образом, важной задачей при моделировании БХ, а также и других нейродегенеративных заболеваний, является подбор оптимального протокола направленной дифференцировки ИПСК в релевантный тип нейронов. Стоит отметить, что процесс дифференцировки *in vitro* повторяет события, происходящие во время онтогенеза. Следовательно, это может позволить отслеживать изменения в клеточных процессах на разных стадиях развития нервной ткани, и тем самым, обеспечить раннюю терапию и приостановить патологические процессы, приводящие к нейродегенерации. Знания о развитии нервной ткани и точное регулирование сигнальных путей, участвующих в этом процессе, является ключевым требованием для дифференцировки и спецификации клеток.

Дифференцировка ИПСК в СШН состоит из трех последовательных этапов:

1. нейрональная индукция;
2. региональная спецификация в клетки, соответствующие типу клеток латерального ганглионарного бугорка (ЛГБ);
3. терминальная дифференцировка.

Нейрональная индукция, которая происходит *in vivo* на стадии гаструлы, является первым шагом в развитии клеток нервной системы. Этот процесс запускается путем ингибирования передачи сигналов BMP (bone marrow protein) и/или активации FGF-пути (fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов) (Muñoz-Sanjuán & Brivanlou, 2002). Для этого производят двойное ингибирование с использованием SB431542 (ингибитор TGF β сигнального пути) и noggin (эндогенный антагонист BMP) или dorsomorphin (малая молекула, ингибитор BMP-сигналинга) (Chambers et al., 2009). При таком ингибировании предотвращается дифференцировка в мезо- и эндодермальные типы клеток и образуются примитивные нейроэпителиальные клетки. Этот тип клеток экспрессирует маркеры переднего мозга, такие как PAX6 и OTX2 (Chambers et al., 2009).

Дальнейшую региональную спецификацию в клетки ЛГБ индуцируют с помощью SHH (sonic hedgehog) или purmorphamine (агонист SHH-сигнального пути), дополненные DKK-1 (dickkopf-1; ингибитор WNT-сигнального пути) в некоторых протоколах (Aubry et al., 2008; Ma et al., 2012; Delli Carri et al., 2013a; Delli Carri et al., 2013b). При развитии эмбриона градиент концентрации SHH в дорзовентральном направлении способствует индукции отдельных клеточных спецификаций в нервной трубке (Ericson et al., 1995), и точная концентрация SHH является критической для корректной индукции спецификации в клетки ЛГБ (Ma et al., 2012).

Существует альтернативный способ региональной спецификации в клетки ЛГБ. Этот протокол основан на данных, что рецепторы активина и фосфорилированный Smad2 вовлечены в сигналинг активина в ЛГБ (Maira et al., 2010), и исследователи показали, что фенотип ЛГБ индуцируется активином А (Arber et al., 2015). По данному протоколу, совместное использование с SHH не усиливает индукцию в клетки ЛГБ. Стоит отметить, что по более ранним данным использование низкой концентрации активина А (10 нг/мл против 25 нг/мл для дифференцировки в СШН) приводило к дифференцировке клеток в кортикальные кальретинин-позитивные интернейроны за счет Gli3-зависимого ингибирования SHH-сигналинга (Cambrey et al., 2012). Таким образом, точно неясно, что именно приводило к различным результатам дифференцировки (СШН и кортикальные кальретинин-положительные интернейроны) – разница в концентрации активина А или другие различия в протоколах, поэтому требуются дальнейшие исследования для решения этого вопроса.

Последний этап – терминальная дифференцировка в СШН, который можно осуществить разными способами (Aubry et al., 2008; Ma et al., 2012; Delli Carri et al., 2013a; Delli Carri et al., 2013b; Arber et al., 2015). Общим компонентом всех способов терминальной дифференцировки является BDNF, который необходим для поддержания жизнеспособности стриарных СШН, поскольку эти клетки сами не экспрессируют ген *BDNF* (Zuccato et al., 2001). Кроме того, в некоторых протоколах используют нейротрофический фактор глиальных клеток (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) (Ma et al., 2012; Arber et al., 2015). Другими компонентами культуральной среды для терминальной дифференцировки являются вальпроевая

кислота, дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ), витамин А, инсулин-подобный фактор роста-1 и инсулин, которые активируют нейрональную дифференцировку и ингибируют пролиферацию нейроэпителиальных клеток и клеток-предшественников. Используя данные протоколы дифференцировки, можно получить 22–51% MAP2-позитивных клеток и до 93% βIII тубулин-позитивных клеток от общей популяции клеток. Из популяции MAP2- и βIII тубулин-положительных клеток (общие нейрональные маркеры), 10–53% экспрессируют кальбиндин, 36–90% ГАМК и 20–53% DARPP32 (один из основных маркеров СШН).

Дополнительным фактором, увеличивающим эффективность терминальной дифференцировки в нейроны, является аскорбиновая кислота, которая присутствует в высоких концентрациях в мозге млекопитающих. Предполагается, что аскорбиновая кислота играет важную роль в формировании и поддержании микроокружения нейронов, усиливает экспрессию генов, участвующих в нейрогенезе, созревании и нейротрансмиссии, а также действует как антиоксидант в головном мозге и оказывает нейропротекторное действие (Haramoto et al., 2008).

2.2. Изогенные клеточные модели как перспективная платформа для изучения наследственных заболеваний и скрининга лекарственных препаратов

Пациент-специфичные ИПСК и их дифференцированные производные безусловно являются важным объектом для изучения молекулярных основ заболеваний человека. Однако, наличие однонуклеотидных полиморфизмов в геноме каждого человека, может оказывать значительные эффекты на фенотип болезни *in vitro*. У пациентов с одним и тем же моногенным заболеванием первые симптомы могут начать проявляться в разном возрасте. Кроме того, тяжесть заболевания так же может различаться (Summers et al., 1996). Это свидетельствует о сильном эпистатическом эффекте генетического фона. Использование пациент-специфичных клеток не позволяет контролировать влияние генетической variability, поэтому возникла необходимость в создании изогенных линий клеток, которые имеют одинаковый генетический фон и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием конкретной мутации, вызывающей патологию. Эти клетки обеспечивают «идеальную» платформу для изучения молекулярных

механизмов развития заболевания, а также высокопроизводительного скрининга новых лекарственных соединений (Soldner et al., 2011).

Изогенные клеточные линии можно получить двумя способами: исправление мутации в клетках пациента или внесение мутации в «здоровые» клетки с помощью гомологичной рекомбинации. При гомологичной рекомбинации происходит перераспределение генетического материала, заключающееся в обменах гомологичными участками между молекулами ДНК, например, между геномной ДНК и донорной молекулой с целевой мутацией (или, в случае исправления мутации, без нее). При этом, донорная молекула ДНК должна иметь участки гомологии на 5' - и 3' -концах, так называемые плечи гомологии. В качестве донорной молекулы обычно используют одноцепочечные олигонуклеотиды и плазмидные векторы. В первом случае одноцепочечные олигонуклеотиды искусственно синтезируют, их оптимальная длина составляет около 90 нуклеотидов (Ma et al., 2003). Плазмидные векторы имеют более длинные плечи гомологии – более 500 пар нуклеотидов. Помимо целевой генетической замены такие плечи гомологии могут также содержать дополнительные генетические элементы, такие как репортерные гены, гены устойчивости к антибиотикам и т.п., что позволяет проводить соответствующую селекцию и отбирать рекомбинантные клоны (Nemudryi et al., 2014).

Существенным ограничением применения гомологичной рекомбинации является низкая вероятность ее протекания в конкретном месте генома. Однако, было показано, что двунитевые разрывы в области гомологии увеличивают эффективность этого процесса (Perez et al., 2005). Разработка технологии «генетических ножниц» CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9-associated) сделала возможным направленное внесение двунитевых разрывов в геном клеток и, таким образом, эффективное получение изогенных клеточных моделей заболеваний человека.

2.2.1. Изогенные клеточные модели БХ, полученные с помощью CRISPR/Cas9

В 2012 году были получены первые изогенные линии ИПСК, моделирующие БХ, путем исправления мутации в пациент-специфичных клетках с помощью гомологичной рекомбинации. ИПСК с исправленной мутацией были дифференцированы в СШН *in vitro* и *in vivo*. Исправление мутации в клетках привело

к нормализации сигнальных путей, нарушенных при БХ – TGF- β , кадгерин, активация каспаз и BDNF, а также к повышению выживаемости клеток и восстановлению митохондриального энергообразования в нейральных стволовых клетках, полученных из ИПСК (An et al., 2012).

Впервые система CRISPR/Cas9 была использована для внесения мутации в ген *HTT* ИПСК в 2014 году (An et al., 2014). В качестве донорной матрицы был использован плазмидный вектор, содержащий 97 CAG-повторов и ген устойчивости к неомицину. Такая конструкция позволила быстро провести селекцию рекомбинантных клонов. Для подтверждения экспрессии мутантного белка авторы работы проводили скрининг на основе Вестерн-блот анализа с помощью антител, связывающихся с полиглутаминовым трактом только в том случае, если число остатков глутамина больше 38. Несмотря на то, что данный метод внесения мутации является эффективным, наличие селекционной кассеты может оказывать нежелательный фоновый эффект на результаты исследований линий клеток.

Альтернативная стратегия по исправлению мутации в клетках от пациента с БХ была использована исследователями из Сингапура в 2017 году (Xu et al., 2017). В работе была использована никаза Cas9, которая вносит односторонний разрыв в ДНК, для уменьшения нецелевой активности и увеличения эффективности гомологичной рекомбинации (Ran et al., 2013). Донорная матрица была создана на основе селекционной кассеты транспозона *piggyBac*, которая позволяет «бесшовно» удалять кассету для селекции с помощью транспозазы. Кассета для селекции содержала ген устойчивости к пуромицину для позитивной селекции и ген тимидинкиназы вируса герпеса для негативной селекции. Мутантные клетки и клетки с исправленной мутацией были дифференцированы в нейроны переднего мозга, при этом клетки с мутацией демонстрировали фенотипические аномалии, такие как низкая эффективность формирования нейральных розеток, высокая чувствительность к недостатку факторов роста и нарушение митохондриального дыхания. При этом все эти признаки не наблюдались в изогенном контроле без мутации. Более того, был проведен сравнительный анализ транскриптома клеток с мутацией и изогенного контроля, а также не изогенного контроля от «здорового» донора. Анализ показал ряд различий в экспрессии генов между клетками с мутацией и неизогенным контролем, при этом не было обнаружено этих же различий

при сравнении с изогенным «здоровым» контролем. Таким образом, на дифференциальную экспрессию генов влияет генетический фон, а не эффекты, ассоциированные с БХ, что подтверждает важность и необходимость использования изогенного контроля.

2.2.2. Инструмент для редактирования генов CRISPR/Cas9

Впервые элементы системы CRISPR/Cas были описаны в 1987 году для *E. coli* (Ishino et al., 1987), а в 2000 году аналогичные элементы были найдены еще у многих других видов бактерий и архей и были названы короткими регулярно расположенными повторами (Mojica et al., 2000), которые в 2002 году были переименованы на CRISPR (Jansen et al., 2002). CRISPR представляют собой короткие участки уникальной ДНК – спейсеры, которые отделены друг от друга короткими палиндромными повторами. CRISPR-локусы находятся в непосредственной близости от cas-генов (CRISPR-associated – ассоциированные с CRISPR), при этом Cas-белки обладают геликазной и нуклеазной ферментативной активностью (Haft et al., 2005). В 2005 году было обнаружено, что спейсеры зачастую гомологичны ДНК многих фагов и плазмид (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005). А в 2007 году было показано, что клетки *Streptococcus thermophilus*, несущие в CRISPR-локусе спейсер, комплементарный участку геномной ДНК бактериофага, становятся устойчивыми к этому фагу (Barrangou et al., 2007). Таким образом, было установлено, что CRISPR/Cas является защитной системой бактерий против бактериофагов (Pennisì et al., 2013).

Механизм защиты включает три основных этапа. На первом этапе короткая последовательность чужеродной ДНК, попавшая в бактерию, встраивается в CRISPR-локус генома бактерии и образуется новый спейсер. В вирусном геноме этот фрагмент называется протоспейсером и фланкирован короткой (2-5 оснований) консервативной последовательностью, называемой PAM (protospacer adjacent motif; мотив, прилежащий к протоспейсеру) (Mojica et al., 2009). Далее, на втором этапе происходит транскрипция локуса CRISPR, и синтезируется длинная pre-crRNA (poly-spacer precursor crRNA; предшественник CRISPR РНК). Затем осуществляется процессинг незрелого транскрипта в зрелые crRNA в большинстве CRISPR/Cas с помощью эндонуклеазы Cas6 у большинства бактерий (Richter et al., 2012). Короткие crRNA длиной 39–45 нуклеотидов содержат последовательность одного спейсера, а

на концах находятся вышеупомянутые палиндромные повторы, которые участвуют в образовании структуры стержень-петля (Hale et al., 2009). На последнем этапе происходит интерференция чужеродной ДНК или РНК, которая обеспечивается за счет взаимодействия комплекса crRNA и Cas белков; crRNA комплементарно связывается с последовательностью протоспейсера, а Cas белки вносят двунитевые разрывы в целевую последовательность.

Все CRISPR/Cas системы подразделяют на три основных типа (I, II и III) и, по меньшей мере, на 10 подтипов. В геномной инженерии в настоящее время наиболее активно используется CRISPR/Cas система II-A типа, выделенная из *Streptococcus pyogenes*. Эта бактерия имеет один многофункциональный белок Cas9, который осуществляет как процессинг pre-crRNA, так и интерференцию чужеродной ДНК (Sapranauskas et al., 2011). Процессинг crRNA зависит также от малой некодирующей РНК – tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA; трансактивирующая crRNA). Молекулы tracrRNA комплементарно связываются с последовательностями повторов в pre-crRNA, формируя дуплекс. Затем, РНКаза III клетки-хозяина разрезает дуплекс с образованием зрелой crRNA, которая содержит 20-нуклеотидный спейсер на 5'-конце. PAM для Cas9 *Streptococcus pyogenes* – 5'-NGG-3' с 3'-конца от протоспейсера, и через три нуклеотида от PAM Cas9 вносит двунитевой разрыв в протоспейсер (Deltcheva et al., 2011).

В настоящее время часто используют химерную sgRNA (single-guide RNA), в которой зрелая crRNA соединена с частью tracrRNA с помощью синтетической структуры «петля-стебель» для имитации естественного crRNA-tracrRNA дуплекса (Jinek et al., 2012).

Благодаря относительной простоте конструирования CRISPR-системы стало возможным исследование функций множества генов. В 2014 году исследователями из Кембриджского университета была разработана библиотека из 64751 уникальных последовательностей sgRNA для полногеномного нокаута 18080 генов – Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout (GeCKO). Эта технология позволяет быстро и эффективно выявлять функции множества генов в различных клеточных процессах в относительно короткий срок. Исходно эта система была создана для поиска генов, обеспечивающих выживаемость и устойчивость к химиотерапии опухолевых клеток (Shalem et al., 2014). Однако библиотеку GeCKO можно использовать в любых

других исследованиях по поиску генов-кандидатов или генов-модификаторов практически всех заболеваний человека, в том числе и наследственных.

В том же году Конерманн и соавт. разработали альтернативную систему на основе CRISPR/Cas9, предназначенную для полногеномной активации транскрипции генов – synergistic activation mediator, SAM (Konermann et al., 2014). Эта система состоит из каталитически неактивной нуклеазы Cas9 (dCas9), связанной с белком VP64, эффекторным комплексом активации транскрипции MS2-p65-HSF1 и модифицированной sgRNA, содержащей аптамеры для улучшения связывания эффекторных доменов с комплексом Cas9. Подобно GeCKO для SAM-системы также создана библиотека sgRNA. Другие модификации ДНК-связывающего домена Cas9 и его связывание с различными регуляторными доменами позволили получить искусственные факторы транскрипции (crisprTF) и эффекторы (Kearns et al., 2014), искусственные эндонуклеазы рестрикции (Guilinger et al., 2014; Tsai et al., 2014), репрессоры транскрипции (dCas9-KRAB) (Gilbert et al., 2013), а также ферменты для эпигенетической регуляции экспрессии генов (Choudhury et al., 2014; Hilton et al., 2015; McDonald et al., 2016; Xu et al., 2016).

3. Заключение

Несмотря на значительный прогресс в раскрытии и понимании молекулярных основ развития БХ, до сих пор нет ясного представления о том комплексном патологическом процессе, протекающем при данном заболевании, и, соответственно, нет эффективных способов приостановления развития болезни, а также купирования симптомов. Создание модельных организмов, которые в разной степени воспроизводят фенотип заболевания, несомненно, внесло огромный вклад в развитие данной области знаний. В последнее время все большее внимание исследователей сосредотачивается на изучении модельных систем БХ, основанных на дифференцированных производных ЭСК и ИПСК. Плюрипотентные клетки могут быть дифференцированы в различные релевантные типы клеток и, таким образом, могут служить удобным объектом для исследования клеточных и молекулярных процессов *in vitro* и скрининга новых лекарственных соединений. Более того, при дифференцировке мутантных ПСК существует возможность проследить последовательность патологических событий, начинающихся в раннем развитии.

Технология редактирования генов CRISPR/Cas9 стала поистине незаменимым инструментом в современной биологии и биомедицине. Использование CRISPR/Cas9 сделало возможным более эффективное получение изогенных линий клеток, которые позволяют избежать влияния генетического фона на результаты исследований и учитывать только специфическое влияние конкретной мутации. Более того, с помощью CRISPR/Cas9 можно также «включать» и «выключать» гены-модификаторы, что позволяет изучать их влияние на патологический фенотип клеток.

Таким образом, существует огромный потенциал совместного использования двух новейших технологий – ПСК и CRISPR/Cas9, и, возможно, в ближайшем будущем будут выявлены гены-мишени не только для эффективной терапии БХ, а также для полного предотвращения нейродегенерации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Конструирование вектора для экспрессии элементов системы CRISPR/Cas9

Плазмидный вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene plasmid #48138) был приобретен в депозитории Addgene. Последовательность спейсера была клонирована в вектор как описано ранее (Ran et al., 2013).

HTT_CRISPR_F 5'-CACCGAGGCCTTCATCAGCTTTTCC-3'

HTT_CRISPR_R 5'-AAACGGAAAAGCTGATGAAGGCCTC-3'

Пары олигонуклеотидов фосфорилировали с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 (New England Biolabs). Затем проводили гибридизацию пары олигонуклеотидов при понижении температуры с 95°C до 25°C со скоростью 0,3°C/с, после чего двухцепочечные олигонуклеотиды клонировали в соответствующий плазмидный вектор, гидролизованный с помощью эндонуклеазы рестрикции *BbsI* (New England Biolabs).

2. Модификация донорной плазмиды

В качестве матрицы для гомологичной рекомбинации был использован плазмидный вектор, полученный ранее в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН (Рисунок 3). В 5'-плечо гомологии вносили синонимичную однонуклеотидную замену. Для этого амплифицировали последовательность донорной плазмиды, используя праймеры, содержащие целевую замену и сайты для ферментов рестрикции *BbsI* и *NcoI* (New England Biolabs).

HTT-BbsI-MutPAM-Forward 5'-CAAGGGAAGACCCAAGTGAGG-3'

HTT-NcoI-MutPAM-Reverse 3'-ACCGCCATGGCGACCTTGGAA-3'

Реакцию ПЦР проводили с помощью полимеразы Q5 High-Fidelity (New England Biolabs). Продукт ПЦР очищали из реакционной смеси с помощью набора реактивов Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Очищенный продукт ПЦР и исходный плазмидный вектор гидролизовали с помощью эндонуклеаз рестрикции *BbsI* и *NcoI*, и затем проводили реакцию лигирования продуктов гидролиза. Наличие целевой замены подтверждали секвенированием по Сэнгеру с

помощью реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Образцы здесь и далее проанализированы в ЦКП "Геномика" ИХБФМ СО РАН.

3. Культивирование клеток линии HEK293FT и эмбриональных фибробластов человека

Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), 1 mM L-глутамина (Thermo Fisher Scientific), 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific). Для диссоциации клеток от поверхности культурального пластика использовали аналог трипсина TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific).

4. Доставка генетических конструкций в клетки

4.1. Химическая трансфекция с помощью полиэтиленимина (PEI)

Клетки рассаживали таким образом, чтобы через 24 ч их плотность достигала 50-60%. Через сутки после пересева за 2 ч до трансфекции добавляли клеткам среду DMEM/F12 с добавлением 2% FBS, 1 mM L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина, 50 ед./мл стрептомицина. На одну реакцию трансфекции смешивали следующую реакцию – плазмидная ДНК (2,5 мкг донорная плазида и 2,5 мкг CRISPR/Cas9-эксперсирующая плазида): PEI (Santa Cruz) : DMEM = 1 : 7 : 100 и инкубировали 10 мин при T_{комн.} Далее добавляли смесь в среду к клеткам и инкубировали 4 ч, после чего меняли среду на свежую с содержанием 10% FBS.

4.2. Электропорация

Клетки рассаживали таким образом, чтобы через 24 ч их плотность достигала 70-80%. Через сутки после пересева проводили электропорацию с помощью прибора Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) при следующих параметрах: 1400 В, 20 мс, 2 импульса. На одну реакцию электропорации использовали 3×10⁵ клеток, 2,5 мкг донорной плазмиды Donor-НТТ-148Q/69Q и 2,5 мкг CRISPR/Cas9-эксперсирующей плазмиды рХ458-НТТ. После реакции электропорации клетки культивировали в среде без антибиотика.

5. Субклонирование клеток после трансфекции

Через 48 часов после трансфекции клетки сортировали по свечению GFP на клеточном сортере S3e (Bio-Rad). Сортированные клетки рассаживали на 96-луночные планшеты из расчёта одна клетка на лунку. После того, как клоны единичных клеток формировали монослой, делали реплики клонов, рассаживая клетки на два одинаковых 96-луночных планшета, один из которых использовали для выделения геномной ДНК для анализа, а второй сохраняли для дальнейшего культивирования.

6. ПЦР-анализ клонов клеток на наличие встройки удлиненного тракта повторов CAG в первый экзон гена *HTT*

Для выделения геномной ДНК субклонов из лунок 96-луночных планшетов отбирали ростовую среду и в каждую лунку добавляли по 35 мкл буфера для выделения ДНК, содержащего 10 mM Tris-HCl pH8.0 (Applichem), 0,35% Igepal (Sigma-Aldrich), 10 mM ЭДТА (Applichem), 0,35% Tween-20 (Applichem), 0,4 мг/мл протеиназа К (Roche), и инкубировали при температуре 65°C во влажной камере в течение 3 ч. Затем планшеты во влажной камере переносили на 4°C на 16 ч. На следующий день в каждую лунку добавляли по 165 мкл деионизованной воды, для ПЦР-анализа в реакции брали по 1-2 мкл образца геномной ДНК (при общем объеме реакции 25 мкл). Для ПЦР использовали следующие праймеры:

HTT-F 5'-CCCAAGGCCACCTCGGCTCAGAGTC-3'

HTT-R 5'-CGCAGGCTGCAGGGTTACCGCCATC-3'

Состав реакционной смеси ПЦР для детекции встройки удлиненного тракта повторов CAG:

ДНК	1-2 мкл
10 mM HTT-F	0,5 мкл
10 mM HTT-R	0,5 мкл
10 mM dNTPs (Синтол)	0,5 мкл
10×буфер для ДНК-полимеразы Taq №1	2,5 мкл
ДМСО (Sigma)	1,5 мкл
50% глицерин (MP Biomedicals)	1,5 мкл
Taq ДНК полимеразы	0,5 мкл

Деионизованная вода

Довести до 25
мкл

Амплификацию проводили на термоциклере S1000 (Bio-Rad) с использованием следующей программы – предварительная денатурация 95°C, 10 мин. Далее 35 циклов: 1. Денатурация 95°C, 30 с. 2. Элонгация 72°C, 3 мин. Элонгация 72°C, 15 мин.

7. Подтверждение отсутствия нецелевых модификаций в последовательности действия системы CRISPR/Cas9

Продукт ПЦР, амплифицированный с помощью праймеров НТТ-F и НТТ-R, очищали с помощью выделения из агарозного геля и затем клонировали в вектор pGEM-T Easy (Promega) согласно протоколу производителя. Далее, проводили секвенирование по Сэнгеру последовательности клонированного фрагмента по вышеописанному протоколу с использованием праймера НТТ-seqF 5'-GCCTTGCTGTGTGAGGCAGAAC-3', который комплементарен последовательности, находящейся в 5'-плече гомологии.

8. Проверка нецелевой активности системы CRISPR/Cas9

Состав реакционной смеси ПЦР:

ДНК	50-100 нг/мкл
10 mM Forward праймер	0,5 мкл
10 mM Reverse праймер	0,5 мкл
2× БиоМастер HS-Тақ ПЦР-Color (Биолабмикс)	10 мкл
Деионизованная вода	Довести до 20 мкл

Использовали следующие пары праймеров:

OFF-1	TTGATTGGTGCCACTGTGTT/CACATGCAGGACAAAGGAGA
OFF-2	CACGATAAAACCCCTCAAA/TCCAGCCAAATTGACTCTCC
OFF-3	CCCCTAACTTGGTGTGTGGT/CTGGTCCTTTGCTGACTGTG
OFF-4	CAAGACCAGGCATCTTCACA/ATGACTGGGGATCCAGCTTT
OFF-5	CGCAGTGCACCTGAGTGATA/GCAGCTTATGGAAAGGAGGA
OFF-27	CTTCTGAGCTTGAGCATCCA/TGGAGGAGTGGAGGAGAGAA

Аmplификацию проводили на термоциклере S1000 (Bio-Rad) с использованием следующей программы – предварительная денатурация 95°C, 5 мин. Далее 35 циклов: 1. Денатурация 95°C, 20 с. 2. Отжиг праймеров 65°C, 20 с. 3. Элонгация 72°C, 30 с. Элонгация 72°C, 5 мин. Далее продукты ПЦР очищали от реакционной смеси с помощью набора реактивов ZymoClean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Секвенирующие реакции проводили с использованием прямого праймера и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Образцы проанализированы в ЦКП "Геномика" ИХБФМ СО РАН. Выравнивание последовательностей проводили с помощью интернет ресурса benchling.com.

9. Вестерн-блот

Клетки наращивали до плотности 80-90%, диссоциировали от культурального пластика с помощью 0,5 mM ЭДТА и ресуспендировали в холодном фосфатно-солевом буфере. Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 300g. Для лизиса 5×10^6 клеток использовали 300 мкл буфера RIPA, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% Igepal, 1% дезоксихолат натрия, 10% додецилсульфат натрия. Клетки лизировали в течение 30 мин при 4°C с постоянной ротацией, затем центрифугировали 20 мин на 12000g при 4°C и отбирали супернатант в охлажденные центрифужные пробирки. Хранили образцы при -70°C.

Концентрацию белков измеряли с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), для анализа использовали по 40 мкг образца. Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле (Bio-Rad) в течение 3 часов при напряжении 100 В. Перенос проводили с использованием мембраны PVDF (Bio-Rad) в буфере для переноса, содержащем 25 mM Tris-base (Applichem), 190 mM глицин (Helicon), 10% метанол (Союзхимпром), в течение 16 ч при напряжении 50 В при 4°C. После переноса мембрану инкубировали с первичными антителами anti-PolyQ (1:2000, MAB1574, Millipore), anti-HTT (1:5000, H7540, Sigma), anti-SMC1 (1:4000, A300-055A, Bethyl), anti-N-cadherin (1:1000, 18-0224, Zymed), anti- β -actin (1:3000, ab8227, Abcam) затем со вторичными антителами anti-mouse HRP и anti-rabbit HRP (Jackson Immunoresearch). Для проявления пероксидазной активности использовали набор Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad).

10. Генотипирование экспансии tandemных CAG-повторов в первом экзоне гена *HTT* методом фрагментного анализа

Аmplификацию фрагментов ДНК, содержащих tandemные CAG-повторы, для последующего фрагментного анализа проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей: Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega), 2.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 10% DMSO, 0.5ед/мкл Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Москва), по 0.5 пкмоль/мкл каждого праймера:

Forward 5'-(Fam)TGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT-3'

Reverse 5'-GGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTG-3'

на термоциклере Verity (Applied Biosystems) по следующему протоколу реакции: предварительная денатурация – 95°C 5 мин. Далее 35 циклов: 1. Денатурация 95°C, 15с. 2. Отжиг праймеров 63°C, 15с. 3. Элонгация 72°C, 25с. Элонгация 72°C, 25 мин.

Анализ количества тринуклеотидных повторов в полученных образцах проводили на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems), используя размерный стандарт Liz 600, с помощью программного обеспечения Data Collection software версии v3.0. Полученные результаты обрабатывались при помощи программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems).

11. Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов кожи человека

Репрограммирование фибробластов к плюрипотентному состоянию проводили согласно протоколу Окита с соавторами (Okita et al., 2011) с модификациями. Фибробласты трансфицировали на приборе Neon Transfection System по протоколу, описанному выше. Для трансфекции был использован набор из 6 эписомных векторов (по 0,5 мкг каждого вектора): pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP и pCXB-EBNA-1 (Addgene IDs #41855-58, #41813-14), которые обеспечивали временную экспрессию факторов репрограммирования *LIN28*, *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *LMYC*, а также генов *EBNA-1* и *Trp53*. После трансфекции клетки рассаживали на культуральную поверхность и культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 1 mM L-глутамин в течение 3 дней. На 4 день меняли среду на среду для ИПСК человека, содержащую 82% среды KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific), 15% KnockOut Serum Replacement (заменитель

сыворотки, Thermo Fisher Scientific), 2 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific), 0,1 мМ раствор заменимых аминокислот (Lonza), 0,1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma), 10 нг/мл bFGF (Thermo Fisher Scientific), 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина (Lonza). На 6 день клетки рассаживали в соотношении 1×10^5 на 100 мм чашку Петри. На 15 день культивирования, первичные колонии ИПСК с ЭСК-подобной морфологией механически переносили на культуральную поверхность, покрытую слоем ЭФМ, в ростовую среду для ИПСК человека.

12. Замораживание клеток

Для замораживания клетки снимали раствором TrypLE Express, центрифугировали 5 мин при 300g, сливали супернатант. Клетки линии НЕК293FT и фибробласты замораживали в растворе, содержащем 10% ДМСО, 40% FBS и 50% ростовой среды, ИПСК - 10% ДМСО и 90% FBS, дифференцированные предшественники нейронов – 80% среда для дифференцировки, 10% ДМСО и 10% FBS. Осадок ресуспендировали и переносили суспензию в ампулы для заморозки клеток. Ампулы с клетками помещали в боксы для криоконсервации (с изопропанолом), обеспечивающие понижение температуры со скоростью 1°C/мин. Боксы помещали на -70°C и через 24 ч ампулы переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом.

13. Размораживание клеток

Ампулы с клетками быстро размораживали при 37°C, постепенно разбавляя ростовой средой (5 мл). Суспензию центрифугировали 5 мин при 300g. Сливали супернатант и ресуспендировали осадок в ростовой среде, после чего клетки переносили в культуральную емкость.

14. Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы

Клетки промывали фосфатно-солевым буфером и сушили на воздухе в течение 15 мин. Затем клетки инкубировали в течение 20 мин в темноте в красителе, содержащем 100 mM Tris-HCl pH 9,0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,4 мкг/мл Naphthol phosphate N-5000 (Sigma); 1 мкг/мл Fast Violet B Salt F-1631 (Sigma), после чего клетки промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии.

15. Анализ кариотипа

ИПСК фиксировали через 48 часов после пересадки. За 3 ч до фиксации в среду к клеткам добавляли CaryoMAX колцеид (Thermo Fisher Scientific) из расчета 5 мкл на 1 мл среды (рабочая концентрация 5 мкг/мл). Затем отбирали среду с колцеидом и добавляли TryptLE Express на 3 мин. Не удаляя TryptLE, добавляли 0,28% KCl (3 мл) и инкубировали в течение 18 мин при 37°C. Затем для префиксации добавляли 2-3 капли фиксатора Карнуа (3:1 метанол:уксусная кислота). Клетки аккуратно ресуспендировали и переносили в пробирку и центрифугировали в течение 5 мин при 500g. Супернатант удаляли, добавляли в осадку по каплям 1 мл холодного фиксатора Карнуа и инкубировали в течение 20 мин на льду. Клетки аккуратно ресуспендировали и центрифугировали в течение 5 минут при 500g. Супернатант сливали, ресуспендировали клетки в 1 мл фиксатора Карнуа и инкубировали в течение 10 мин на льду. Далее центрифугировали в течение 5 минут при 500g, сливали супернатант, добавляли холодный фиксатор Карнуа и 50-70 мкл клеточной суспензии капали на охлажденные влажные предметные стекла и сушили под потоком теплого воздуха. Для анализа кариотипов препараты с метафазными пластинками окрашивали DAPI (50 нг/мл). Анализировали по 100 метафаз.

16. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки префиксировали в среде для культивирования с 1,3% ПФА в течение 5 мин при $T_{\text{комн}}$. Затем убрали префиксатор и инкубировали в 4% ПФА в течение 10 мин при $T_{\text{комн}}$. Далее отмывали фосфатно-солевым буфером два раза по 15 мин. Пермеабиллизацию проводили с использованием 0,5% Triton X-100 (Sigma) в течение 30 мин при $T_{\text{комн}}$. Затем отмывали фосфатно-солевым буфером два раза по 15 мин. Клетки инкубировали в блокирующем буфере (10 мг/мл раствор БСА в фосфатно-солевом буфере) 30 мин при $T_{\text{комн}}$.

Клетки инкубировали с первичными антителами в течение 16 ч при 4°C, со вторичными антителами - 2 ч при $T_{\text{комн}}$. Первичные и вторичные антитела, использованные в данной работе приведены в таблице 2. Для окрашивания ядер клеток использовали краситель DAPI (Vector Laboratories). Анализ препаратов производили на микроскопе Nikon Ti с помощью программного обеспечения фирмы.

Таблица 2. Антитела, использованные при иммунофлуоресцентном окрашивании.

Антитела	Производитель	Тип	Рабочее разведение	Каталожный номер
Первичные				
GABA	Sigma	IgG кролика поликлональные	1:500	ABN131
PAX6	Santa Cruz Biotechnology	IgM мыши моноклональные	1:50	sc-81649
SOX1	R&D systems	IgG козы поликлональные	1:200	AF3369
OTX2	R&D systems	IgG козы поликлональные	1:400	AF1979
TuJ1	Covance	IgG2a мыши моноклональные	1:100	801201
NF200	Sigma	IgG кролика поликлональные	1:1000	N4142
MAP2	Abcam	IgG курицы поликлональные	1:1000	ab5392
SOX2	Cell Signaling	IgG кролика поликлональные	1:500	3579
TRA-1-60	Abcam	IgM мыши моноклональные	1:200	ab16288
NANOG	Abcam	IgG мыши моноклональные	1:200	ab62734
OCT4	BD Transduction Lab	IgG мыши моноклональные	1:50	611202
α SMA	DAKO	IgG мыши моноклональные	1:100	M0851
HNF3B	Millipore	IgG кролика поликлональные	1:200	07-633
HTT	Sigma	IgG кролика поликлональные	1:100	H7540
PolyQ	Millipore	IgG мыши моноклональные	1:400	MAB1574
Cleaved caspase-3	Cell Signaling	IgG кролика поликлональные	1:400	9661
ZO-1	Invitrogen	IgG1 мыши моноклональные	1:50	33-9100
Вторичные				
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A11078
Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A-11011
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A28175
Alexa Fluor 488 goat	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A-21131

anti mouse IgG2a	Alexa Fluor 568 goat	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A-21134
anti mouse IgG2a	Alexa Fluor 488 goat	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A-21121
anti mouse IgG1	Alexa Fluor 488 goat	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A-21151
anti mouse IgG3	Alexa Fluor 568 goat	Thermo Fisher Scientific	Козы поликлональные	1:400	A21043
anti goat IgG (H+L)	Alexa Fluor 488 rabbit	Thermo Fisher Scientific	Кролика поликлональные	1:400	A27012
anti goat IgG (H+L)	Alexa Fluor 568 rabbit	Thermo Fisher Scientific	Кролика поликлональные	1:400	A-11079
anti chicken IgY H&L	Alexa Fluor 488 goat	Abcam	Козы поликлональные	1:400	ab150169

17. Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*

При достижении ИПСК плотности 90% на 100 мм чашках Петри клетки промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 2 мл фермента Collagenase IV, растворенного в среде DMEM/F12 (рабочая концентрация 1 мкг/мл) и инкубировали при 37°C. После изменения морфологии колоний отбирали фермент, остатки которого инактивировали ростовой средой для фибробластов. Клетки аккуратно

смывали средой и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант отбирали с помощью серологической пипетки, аккуратно ресуспендировали осадок клеток в ростовой среде для фибробластов и переносили в чашки Петри, покрытые 1% агарозой. Через 14 дней культивирования ЭТ пересаживали для распластывания на поверхность, покрытую 0,1% желатином. Затем клетки культивировали еще в течение 14 дней.

18. Выделение РНК и синтез кДНК

Клетки лизировали в 1 мл TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) и РНК выделяли согласно протоколу производителя. Далее выделенную РНК очищали от контаминации ДНК с помощью набора реактивов DNA-free Kit (Ambion) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили с использованием набора SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя.

19. Количественная ПЦР в реальном времени

Состав реакционной смеси ПЦР для определения уровня экспрессии генов:

кДНК (25-кратное разведение)	2 мкл
10 mM Forward праймер	0,5 мкл
10 mM Reverse праймер	0,5 мкл
2×HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс)	10 мкл
Деионизованная вода	Довести до 20 мкл

Использовали следующие пары праймеров:

<i>b-ACTIN</i>	AGGCACCAGGGCGTGAT/GATAGCACAGCCTGGATAGCA
<i>NANOG</i>	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTC ACC
<i>OCT3/4</i>	СТТСТГСТТCAGGAGCTTGG/GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
<i>SOX2</i>	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/AACCCCAAGATGCACAATC
<i>HPRT</i>	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG/AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG
<i>SOX1</i>	ATTATTTTGCCCGTTTTCCC/TCAAGGAAACACAATCGCTG
<i>PAX6</i>	TCCGTTGGAACCTGATGGAGT/GTTGGTATCCGGGGACTTC

<i>MAP2</i>	TTCGTTGTGTCGTGTTCTCA/AACCGAGGAAGCATTGATTG
<i>SYP</i>	CAATGCCTGCCTGAACAAAG/GGGTCCTAAACTGTCCTCTCTA
<i>ARPP21</i>	CTGGATGAAGAGGAGAACTGG/CCTGCTCCTGACTTGGATTT
<i>GAD1</i>	AAACCGTGCAATTCCTCCTG/GCAACTGGTGTGGGTGATGA
<i>CTIP2</i>	AGTGGCCGCGTGTATATTG/GCCCAGGCATTCTCGATTATTA
<i>DRD1</i>	CAACCTGAACTCGCAGATGAA/CAGAGTCTCACCGTACCTTAGT
<i>DRD2</i>	CACTCCTCTTCGGACTCAATAAC/GACAATGAAGGGCACGTAGAA
<i>CALB1</i>	CCGAACGGATCTTGCTCTTAT/ACTCCCTTATAGTGCACAGTTATT
<i>FOXP2</i>	CCAAAGCATCACCACCAATAAC/CTGTCTCGTCTTGCACCTAGAA

Аmplification проводили на термоциклере LightCycler 480 (Roche) с использованием следующей программы – предварительная денатурация 95°C, 5 мин. Далее 40 циклов: 1. Денатурация 95°C, 15 с. 2. Элонгация 60°C, 1 мин. Для амплификации гена *NANOG* была использована программа – предварительная денатурация 95°C, 5 мин. Далее 40 циклов: 1. Денатурация 95°C, 15 с. 2. Отжиг праймеров 64°C, 15 с. 3. Элонгация 60°C, 20 с.

В качестве референсного гена для генов-маркеров плюрипотентности использовали *b-ACTIN*, для маркеров нейрональной дифференцировки - *HPRT*. Для построения калибровочной кривой и определения эффективности ПЦР для каждой пары праймеров использовали 5 разведений кДНК – в 5, 25, 125, 625 и 3125 раз. Анализ полученных данных проводили по алгоритму $2^{-\Delta\Delta CT}$ в программе LightCycler 480 SW 1.5 (Roche), а также Microsoft Excel 2016. Все ПЦР были проведены в трех технических повторах. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы в реакцию добавляли смеси реакций для синтеза кДНК без обратной транскриптазы.

20. Направленная дифференцировка ИПСК в СШН

Среды для нейрональной дифференцировки

НД-1

- Смесь сред (2:1) F12/DMEM (Lonza) : Neurobasal medium (Life Technologies)
- 1× бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific)
- 4 нг/мл bFGF (Thermo Fisher Scientific)
- 100 нг/мл LDN 193189 (Sigma)
- 8 мкМ SB 431542 (Selleckchem)

- 2 мкМ Dorsomorphin (Sigma)
100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина (Lonza)
- 0,65 мкМ Purmorphamine (Stemolecule). *Добавляется со 2 дня дифференцировки*
НД-2
- Смесь сред (2:1) F12/DMEM (Lonza) : Neurobasal medium (Life Technologies)
- 1× бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific)
- 4 нг/мл bFGF (Thermo Fisher Scientific)
- 100 нг/мл LDN193189 (Sigma)
- 0,65 мкМ Purmorphamine (Stemolecule)
- 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина (Lonza)
NeuroB
- Neurobasal medium (Life Technologies)
- 1× бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific)
- 20 нг/мл BDNF (PeproTech)
- 1,1 мМ аскорбиновая кислота (Sigma)
- 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина (Lonza)
NeuroBC
- Neurobasal medium (Life Technologies)
- 1× бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific)
- 20 нг/мл BDNF (Peprotech)
- 1,1 мМ аскорбиновая кислота (Sigma)
- 10 нг/мл CNTF (BioLegend)
- 25 нг/мл Activin A (Peprotech)
- 0,5 мМ цАМФ (Sigma)
- 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина (Lonza)

ИПСК пересаживали на матрикс Matrigel-ESQ (Corning) и наращивали до плотности 70-80% в течение 3-4 дней. После того, как плотность клеток достигала необходимого значения (1 день дифференцировки) клеткам меняли среду на нейрональную НД-1. На 2 день дифференцировки в среду НД-1 добавляли Purmorphamin (0,65 мМ). В данной среде клетки культивировали в течение 5 дней. На 6 день дифференцировки меняли среду на НД-2, в которой культивировали клетки в течение 7 дней. Смену среды проводили ежедневно. На 13 день

дифференцировки клетки пересаживали на матрикс Matrigel-ESQ с помощью фермента Accutase (Thermo Fisher Scientific) и добавляли смесь сред НД-2:NeuroB (1:1) с 10 мкМ ROCK-ингибитором (StemRD). На 14 день дифференцировки меняли среду на NeuroB. Клетки пересаживали каждые 5-7 дней из расчёта 2×10^5 клеток/см², а также замораживали по 2×10^6 клеток на ампулу. Для терминальной дифференцировки в СШН клетки-предшественники пересаживали на матрикс Matrigel-ESQ из расчета $1-2 \times 10^4$ клеток/см² и культивировали в среде NeuroBS.

21. Формирование нейральных розеток

При достижении ИПСК плотности 90% на 100 мм чашках Петри клетки промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 2 мл фермента Collagenase IV, растворенного в среде DMEM/F12 (рабочая концентрация 1 мкг/мл) и инкубировали при 37°C. После изменения морфологии колоний отбирали фермент, остатки которого инактивировали ростовой средой для фибробластов. Клетки аккуратно смывали средой и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант отбирали с помощью серологической пипетки, аккуратно ресуспендировали осадок клеток в среде для ИПСК без bFGF и переносили в чашки Петри, покрытые 1% агарозой. Среду меняли через 1-2 дня. Через 5 культивирования среду меняли на среду для нейральной дифференцировки, состоящей из F12/DMEM, N2, 0.1 мМ NEAA (Thermo Fisher Scientific), 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина и 5 нг/мл bFGF. На 15-17 день дифференцировки ЭТ пересаживали для распластывания на поверхность, покрытую матриксом Matrigel-ESQ и культивировали еще в течение 5-7 дней.

22. Тест на чувствительность клеток к удалению BDNF

Предшественники СШН сажали на 48-ячеечный планшет в плотности $1,7 \times 10^5$ клеток/см² в среде для предшественников NeuroB. Через 24 часа после пересадки меняли на среду Neurobasal, 1% БСА, 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина. Через 24 ч клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител против активированной каспазы-3 (Таблица 2). Далее проводили обсчет полей зрения по результатам трех независимых биологических повторов, в каждой из которых было использовано не менее 6

случайных полей зрения. Для анализа изображений использовалось программное обеспечение ImageJ.

24. Статистический анализ данных

Эксперименты по определению относительного уровня экспрессии генов, полуколичественному анализу вестерн-блот, спонтанной нейральной дифференцировке и тесту на чувствительность клеток-предшественников к отсутствию BDNF были проведены в трех биологических повторах. Полуколичественный вестерн-блот был проведен также в трех технических повторах.

Для количественного обсчета уровня белка на изображениях мембран использовали программное обеспечение Image Lab (Bio Rad). В качестве референсного белка использовали b-actin.

Для определения процента каспаза-3-позитивных клеток в тесте на чувствительность клеток-предшественников к отсутствию BDNF проводили подсчет по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания, при этом было использовано не менее 6 случайных полей зрения. Для анализа использовали программу ImageJ.

Для всех сравнений был использован однофакторный дисперсионный анализ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Дизайн и проверка системы для внесения мутации в ген *HTT* человека

1.1. Выбор последовательности протоспейсера для действия

CRISPR/Cas9 в локусе *HTT* и внесение синонимичной замены в последовательность донорного вектора

Для внесения мутации в ген *HTT* в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН был ранее сконструирован набор донорных векторов для гомологичной рекомбинации в локусе *HTT* (Малахова и соавт., 2016). Все векторы содержали длинные плечи гомологии к последовательности 1 экзона гена *HTT*: 5'-плечо – 470 п.н., 3'-плечо – 1358 п.н., и различались только числом повторов CAG, которые были фланкированы плечами гомологии. Так, донорные плазмиды содержали от 39 до 215 повторов CAG (Рисунок 3).

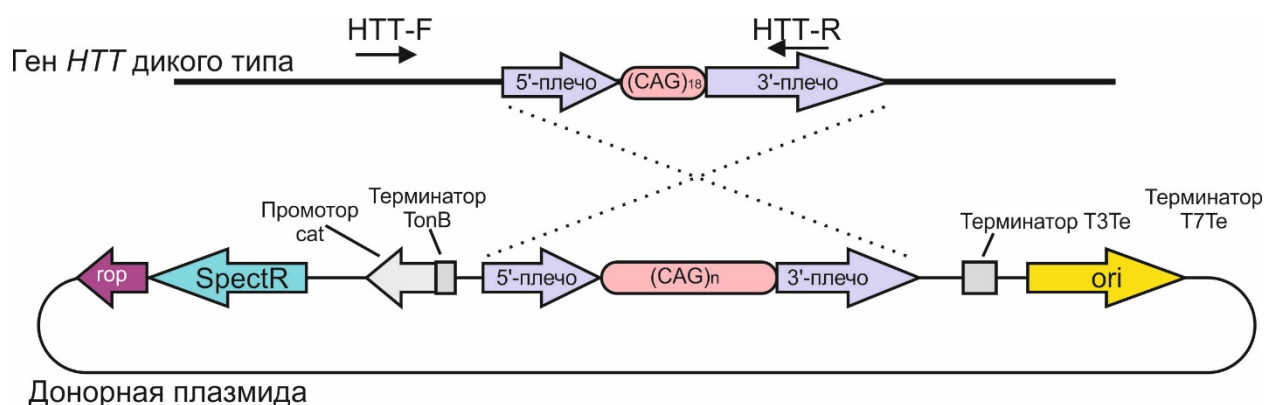


Рисунок 3. Схема гомологичной рекомбинации между локусом *HTT* и донорной плазмидой. HTT-F и HTT-R – праймеры для определения встройки удлиненного тракта повторов CAG в локус *HTT*.

Известно, что внесение двунитевых разрывов на участке гомологии между донорной молекулой ДНК и целевым сайтом генома способствует увеличению эффективности гомологичной рекомбинации (Yang et al., 2013). При этом, наибольшая эффективность достигается в том случае, если сайт гидролиза находится в максимальной близости к последовательности генома, которую необходимо редактировать, и в пределах 5'-плеча гомологии (Zhang et al., 2014). Поэтому выбирали последовательность протоспейсера для действия системы CRISPR/Cas9, расположенную в 5'-плече гомологии и наиболее близко к тракту повторов CAG в гене *HTT*. Следовательно, выбранный спейсер плазмиды pX548-HTT,

экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, комплементарен протоспейсеру, который есть и в геноме, и в донорной плазмиде. Это ведет к тому, что система CRISPR/Cas9 может гидролизовать как целевой участок в геноме клеток, так и донорную плазмиду и локус *HTT* после рекомбинации. Так, при гидролизе донорной плазмиды может значительно снизиться эффективность гомологичной рекомбинации в целевом локусе. При гидролизе рекомбинантного локуса и последующей репарации двунитевого разрыва ДНК путем негомологичного соединения концов могут возникнуть небольшие инсерции или делеции, которые приведут к сдвигу рамки считывания и нокауту по данному аллелю. Таким образом, необходимой стратегией была “защита” донорного вектора и рекомбинантного локуса от гидролиза системой CRISPR/Cas9. Поэтому еще одним условием при выборе протоспейсера была возможность внесения синонимичной замены в PAM 5'-NGG-3' в последовательности донорной плазмиды. Синонимичная замена позволит изменить каноническую последовательность PAM на неканоническую, что приведет к снижению эффективности гидролиза системой CRISPR/Cas9 целевого сайта и, соответственно, снизит вероятность гидролиза как донорной плазмиды, так и локуса *HTT* после рекомбинации (Zhang et al., 2014). Это в свою очередь приведет к повышению эффективности гомологичной рекомбинации ввиду сохранения целостности донорной матрицы и позволит избежать нецелевых модификаций рекомбинантного локуса.

Так, руководствуясь вышеуказанными принципами был выбран протоспейсер в 5'-плече гомологии локуса *HTT* на расстоянии 20 п.н. от тракта повторов CAG (Рисунок 4). С помощью методов молекулярного клонирования была внесена синонимичная замена C>T (в некодирующей цепи – G>A) в 5'-плечо гомологии донорных плазмид, содержащих 69 и 148 повторов CAG (плазмида Donor-*HTT*-69Q и Donor-*HTT*-148Q). Эта замена изменила каноническую последовательность PAM 5'-AGG-3' на неканоническую 5'-AAG-3', которая значительно снижает нуклеазную активность Cas9 (Рисунок 4) (Zhang et al., 2014).

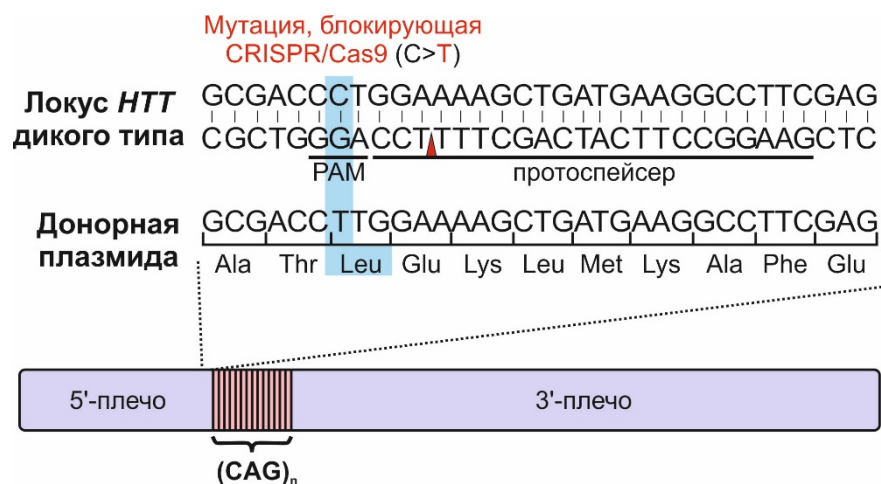


Рисунок 4. Расположение последовательности протоспейсера в локусе *HTT* и синонимичной однонуклеотидной замены в донорной плазмиде. Красным треугольником обозначено место внесения двунитевого разрыва системой CRISPR/Cas9.

В работе были использованы донорные плазмиды, содержащие 69 и 148 триплетов CAG, поскольку линии клеток с небольшим количеством повторов (40-50 повторов CAG) можно получить из пациентов, а пациенты, содержащие более длинные тракты повторов (CAG>60), встречаются довольно редко, и исследование патологического влияния такой мутации является актуальной задачей. Кроме того, внесение в геном клеток большого числа повторов позволит смоделировать ювенильную форму БХ (раннее появление симптомов до 30 лет), и, возможно, что в таких клетках будут наблюдаться более значительные патологические нарушения, чем в культуре пациент-специфичных клеток с меньшим числом повторов.

1.2. Проверка системы для внесения мутации в ген *HTT* на клетках линии HEK293FT

Корректность работы созданной системы для внесения мутации в *HTT* была проверена на клетках линии HEK293FT. Данная работа включала в себя установление точности встройки мутации, а также ее «функциональности», а именно – подтверждение экспрессии мутантного белка хантингтина.

Для проверки эффективности полученной системы клетки линии HEK293FT трансфицировали плазмидами Donor-*HTT*-69Q/pX458-*HTT* и Donor-*HTT*-148Q/pX458-*HTT*. Определение встройки мутации проводили с помощью ПЦР. Амплифицировали целевой участок гена *HTT* с использованием олигонуклеотидных праймеров *HTT*-F и *HTT*-R (Рисунок 3). Праймер *HTT*-F комплементарен участку за пределами 5'-плеча гомологии, а праймер *HTT*-R комплементарен участку в

пределах 3'-плеча гомологии, что позволило амплифицировать только геномный участок ДНК и избежать ложноположительного результата при амплификации донорной плазмиды. После электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР отбирали те клоны клеток, ПЦР-продукт которых имел больший молекулярный вес, поскольку встройка 69 и 148 повторов CAG должна была увеличить размер продукта ПЦР на 150 и 390 п.н. соответственно. В итоге, было проанализировано 136 клонов клеток, из которых 2 клон, HEK293FT-F1 и HEK293FT-B5, имели продукты с большим молекулярным весом, в отличие от продукта ПЦР с участка *HTT* дикого типа. При этом, клон HEK293FT-F1 имел гомозиготную встройку удлиненного тракта повторов, а клон HEK293FT-B5 – гетерозиготную (Рисунок 5А).

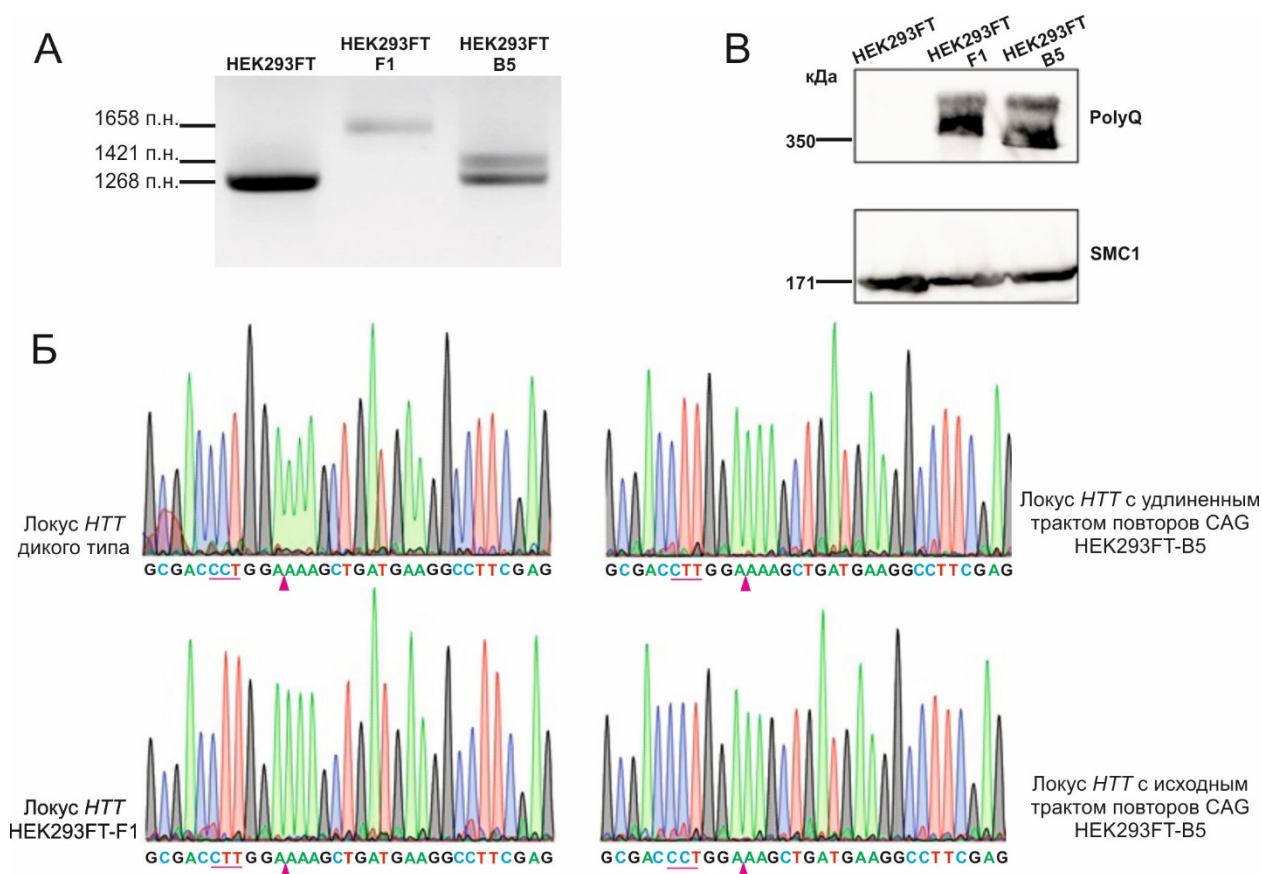


Рисунок 5. Результаты проверки системы для редактирования локуса *HTT* на клетках линии HEK293FT.

- (А) Анализ клонов клеток на наличие встройки удлиненного тракта повторов CAG в локус *HTT* с помощью ПЦР;
 (Б) Секвенограмма последовательности *HTT* в области гидролиза системой CRISPR/Cas9;
 (В) Анализ синтеза мутантного хантингина с помощью метода вестерн-блот.

Следующий этап проверки системы – подтверждение точной встройки тракта повторов CAG, а именно секвенирование участка локуса *HTT*, в который был внесен

двунитевой разрыв системой CRISPR/Cas9. Для этого продукты ПЦР, амплифицированные с использованием праймеров НТТ-F и НТТ-R и очищенные с помощью выделения из агарозного геля, клонировали в вектор pGEM-T Easy (Promega), после чего проводили секвенирующие реакции.

Результаты данного анализа показали следующее: у клона с гомозиготной встройкой удлиненного тракта повторов НЕК293FT-F1 присутствует целевая замена С>Т и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК; у клона с гетерозиготной встройкой удлиненного тракта повторов НЕК293FT-B5 в аллеле с удлиненным трактом повторов так же присутствует замена и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК. Однако, в аллеле с нормальным числом повторов САG в точке разрыва ДНК была обнаружена делеция аденина (Рисунок 5Б). Таким образом, наличие однонуклеотидной замены предотвратило повторный гидролиз протоспейсера и, соответственно, возникновение нецелевых модификаций.

Последний этап анализа системы – доказательство экспрессии мутантного хантингтина в клетках с помощью метода вестерн-блот с использованием белковых экстрактов, полученных из клеток НЕК293FT-F1, НЕК293FT-B5 и НЕК293FT (в качестве отрицательного контроля) с антителами против полиглутаминовых трактов (polyQ). Антитела против polyQ позволяли детектировать белки, содержащие полиглутаминовые тракты из 39 и более остатков глутамина. Таким образом, обнаружение polyQ-позитивных полос с молекулярным весом около 350 кДа (молекулярный вес хантингтина) в полученных клонах клеток при данном анализе подтвердит экспрессию мутантного хантингтина. При этом, в отрицательном контроле – образце НЕК293FT, не содержащем удлиненный полиглутаминовый тракт, – не должны детектироваться позитивные полосы в области 350 кДа. Так, в результате анализа вестерн-блот была подтверждена экспрессия мутантного *НТТ* на уровне белков в клонах НЕК293FT-F1 и НЕК293FT-B5 (Рисунок 5В).

Таким образом, с помощью вышеописанных методик было показано, что созданная система может быть использована для эффективного внесения удлиненного тракта повторов САG в локус *НТТ* и, соответственно, для создания клеточных моделей БХ.

2. Внесение мутации в ген *HTT* эмбриональных фибробластов человека и получение клонов ИПСК с целевой мутацией

2.1. Внесение удлиненного тракта повторов CAG в экзон 1 гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека

Первоначальной задачей являлось внесение мутации в детально охарактеризованные ИПСК линии iMA-1L, полученной после репрограммирования эмбриональных фибробластов человека линии MA№1 (Grigor'eva et al., 2018). Однако, после ПЦР-анализа клонов ИПСК после трансфекции плазмид в комбинациях Donor-*HTT*-69Q/pX458-*HTT* и Donor-*HTT*-148Q/pX458-*HTT*, не было найдено ни одного клона с целевой встройкой. Такой результат, возможно, связан с затрудненной доступностью целевого сайта для действия системы CRISPR/Cas9 из-за эпигенетических модификаций геномного локуса (Chen et al., 2016). Это может быть обусловлено низкой эффективностью трансфекции ИПСК, и, соответственно, низкой вероятностью доставки в клетку необходимого количества плазмид для эффективной гомологичной рекомбинации (Mellott et al., 2013). Стоит также отметить, что частота событий гомологичной рекомбинации в плюрипотентных стволовых клетках человека достаточно низкая, и эти клетки трудно поддаются генно-инженерным манипуляциям (Soldner et al., 2011; He et al., 2016).

Ввиду вышеописанных затруднений была выбрана новая стратегия – внесение мутации в эмбриональные фибробласты линии MA№1 и репрограммирование клонов клеток с целевой встройкой к плюрипотентному состоянию (Рисунок 6).

Эмбриональные фибробласты были трансфицированы аналогично клеткам линии HEK293FT. GFP-позитивные клетки так же были отсортированы и рассажены на 96-луночные планшеты из расчета 4 клетки на лунку. Такое разведение клеток было выбрано из-за низкой эффективности субклонирования фибробластов, и рассадка по 1 клетке на лунку могла снизить общее число клонов для анализа.

С помощью ПЦР было проанализировано 603 клон фибробластов, среди которых было выявлено 23 клон со встройками различной длины (Рисунок 7А). Эффективность гомологичной рекомбинации в локусе *HTT* в фибробластах составила около 4%, что согласуется с литературными данными (Lin et al., 2014).



Рисунок 6. Схема получения изогенной панели ИПСК с мутацией в гене *HTT* из эмбриональных фибробластов человека.

Для подтверждения точной встройки тракта повторов CAG был проведен анализ, использованный для клеток HEK293FT и описанный ранее, - секвенирование по Сэнгеру области, содержащей сайт двунитевого разрыва в локусе *HTT*. Для анализа было выбрано 2 клон фибробластов – 2D12 и 3D8. Так, у клон с гетерозиготной встройкой удлиненного тракта повторов 2D12 в аллеле с удлиненным трактом повторов присутствует целевая замена C>T и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК; в аллеле с нормальным числом повторов CAG в точке разрыва ДНК не было обнаружено модификаций, вызванных двунитевым разрывом (Рисунок 7Б). У клон 3D8 с гомозиготной встройкой удлиненного тракта повторов CAG в обоих аллелях так же присутствует целевая замена и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК.

На рисунке 7В приведен результат анализа вестерн-блот с использованием антител против полиглутаминового тракта (polyQ) и N-концевого фрагмента хантингтина (HTT), в результате которого был подтвержден синтез мутантного хантингтина в клон с внесенной мутацией 2D12 и 3D8. В качестве отрицательного контроля был использован белковый экстракт клеток линии iMA-1L, изогенного «здорового» контроля, а в качестве положительного контроля – белковый экстракт клеток линии 47Q-2Lf, пациент-специфичных ИПСК с 47 повторами CAG в 1 экзоне *HTT* (Grigor'eva et al., 2019).

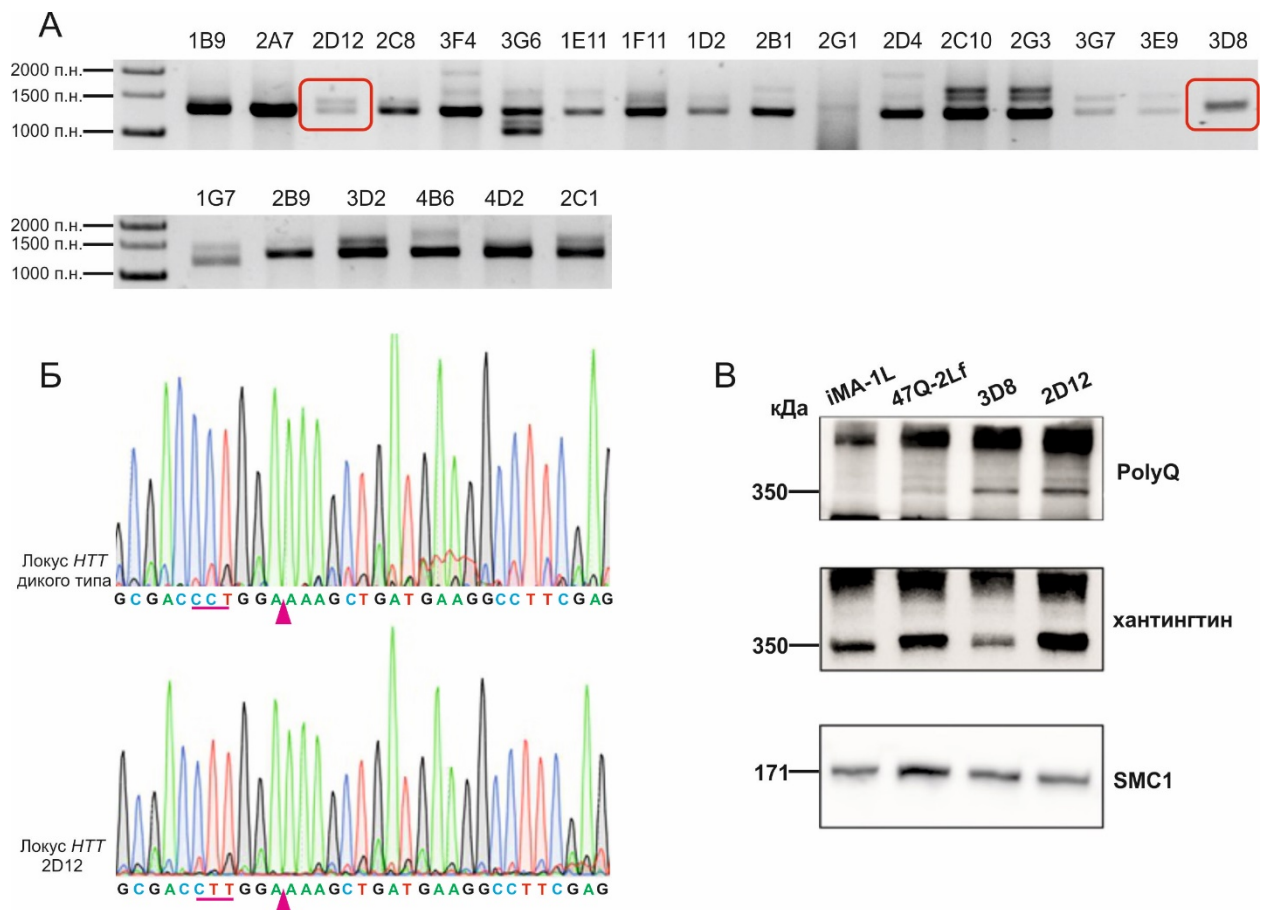


Рисунок 7. Внесение удлиненного тракта повторов CAG в 1 экзон гена *HTT* с помощью разработанной системы на основе гомологичной рекомбинации и CRISPR/Cas9.
 (А) Анализ клонов клеток на наличие встройки удлиненного тракта повторов CAG в локус *HTT* с помощью ПЦР;
 (Б) Секвенограмма последовательности *HTT* в области гидролиза системой CRISPR/Cas9;
 (В) Анализ синтеза мутантного хантингтина с помощью метода вестерн-блот.

2.2. Проверка нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в геноме клонов фибробластов с мутацией в гене *HTT*

Согласно литературным данным система CRISPR/Cas9 способна вносить двунитевые разрывы в нецелевые сайты генома, которые отличаются от целевой последовательности на несколько нуклеотидов. Кроме того, вероятность нецелевого разрыва также зависит от того, в каком месте нецелевого сайта находятся замены. Так, было показано, что однонуклеотидные замены, локализованные в области последних 8-12 нуклеотидов на 3'-конце сайта гидролиза (ближе к последовательности PAM), приводят к существенному снижению активности системы CRISPR/Cas9, в то время как замены на 5'-конце практически не влияют на работу системы (Fu et al., 2013; Jiang et al., 2013). Таким образом, при

редактировании геномов является важным оценка и проверка нецелевой активности созданных генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9.

Для поиска нецелевых сайтов выбранного спейсера в геноме человека был использован web-ресурс benchling.com, который позволяет найти наиболее возможные последовательности гидролиза в геноме исследуемого объекта (Таблица 3).

Таблица 3. 27 наиболее вероятных нецелевых сайта в геноме человека для спейсера системы CRISPR/Cas9, направленного на локус *HTT*. Зеленым цветом выделен целевой протоспейсер, оранжевым – исследованные нецелевые протоспейсеры.

Последовательность	PAM	Score	Хромосома	Ген	Цепь ДНК	Число замен
AGGCCTTCATCAGCTTTTCC	AGG	100	4	<i>HTT</i>	-	0
AAGCCTTCATCATCTTTTCC	TGG	3,60441176	2		-	2
CAGCTTTCATCAGCTTTTCC	AGG	2,50329381	8		+	4
ATGATTTTCATCAGCTTTTCC	GAG	2,4265645	6		-	3
AGCCSTATATCAGCTTTTCC	CAG	1,74086014	22		+	4
ATGCATTCTTCAGCTTTTCC	CAG	1,68981077	12		+	3
GGGCCCTCAGCAGCTTTTCC	TGG	1,65679108	5		+	3
AGCCTTTCATGAGCTTTTCC	CAG	1,56823077	2		-	3
CAGCCTTCATCAGCTTCTCC	AAG	1,55307856	22		-	3
CAGCTTTAATCAGCTTTTCC	TAG	1,50316456	4		-	4
TGGTCTTAAGCAGCTTTTCC	TAG	1,47132848	5		+	4
TTTCCTTCAACAGCTTTTCC	TGG	1,41271949	11		-	4
AGTCCTCCATCAGCTTTTCT	AAG	1,19365756	8		+	3
GAGCCTGGATCAGCTTTTCC	TGG	1,04428648	14		-	4
TGGGCTGAATCAGCTTTTCC	TGG	1,02666139	6		+	4
TGGCTTCCAGCAGCTTTTCC	AAG	0,98720955	7		-	4
ATGGCTGCAGCAGCTTTTCC	AAG	0,97011502	X		-	4
AAGAATCCATCAGCTTTTCC	AAG	0,96173419	2		+	4
AATTCTACATCAGCTTTTCC	TAG	0,94826991	9		+	4
AAATCTCCATCAGCTTTTCC	GAG	0,94826991	6		-	4
TGCCCTTGGTTCAGCTTTTCC	TGG	0,94546867	20		-	4
AGGGCCTCATGAGCTTTTCC	AAG	0,92863537	9		+	3
AGGGCTGTAGCAGCTTTTCC	CAG	0,90727356	16		+	4
AGGGCTGTAGCAGCTTTTCC	CAG	0,90727356	16		+	4
TAGCATTCATCAGCTTTTCA	AGG	0,90034091	5		+	4
TAGCTTTCATCAGCTTTTCA	AAG	0,90034091	X		-	4
TAGCTTTCATCAGCTTTTCA	AAG	0,90034091	11		+	4
TTGCTTTCATCAGCTTTTCA	AAG	0,90034091	22	<i>HMGXB4</i>	+	4

В результате для анализа были выбраны первые 5 наиболее вероятных нецелевых сайтов в геноме человека. Кроме того, все 5 сайтов находились в некодирующих участках генома. Дополнительно, был выбран также 27-й по счету нецелевой сайт, который находился в белок-кодирующем гене *HMGXB4*. Далее,

последовательности ДНК, содержащие нецелевые сайты, off-target 1, off-target 2, off-target 3, off-target 4, off-target 5 и off-target 27, в геноме клеток MAN $\text{\#}1$, 2D12 и 3D8 были амплифицированы, и затем продукты ПЦР проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

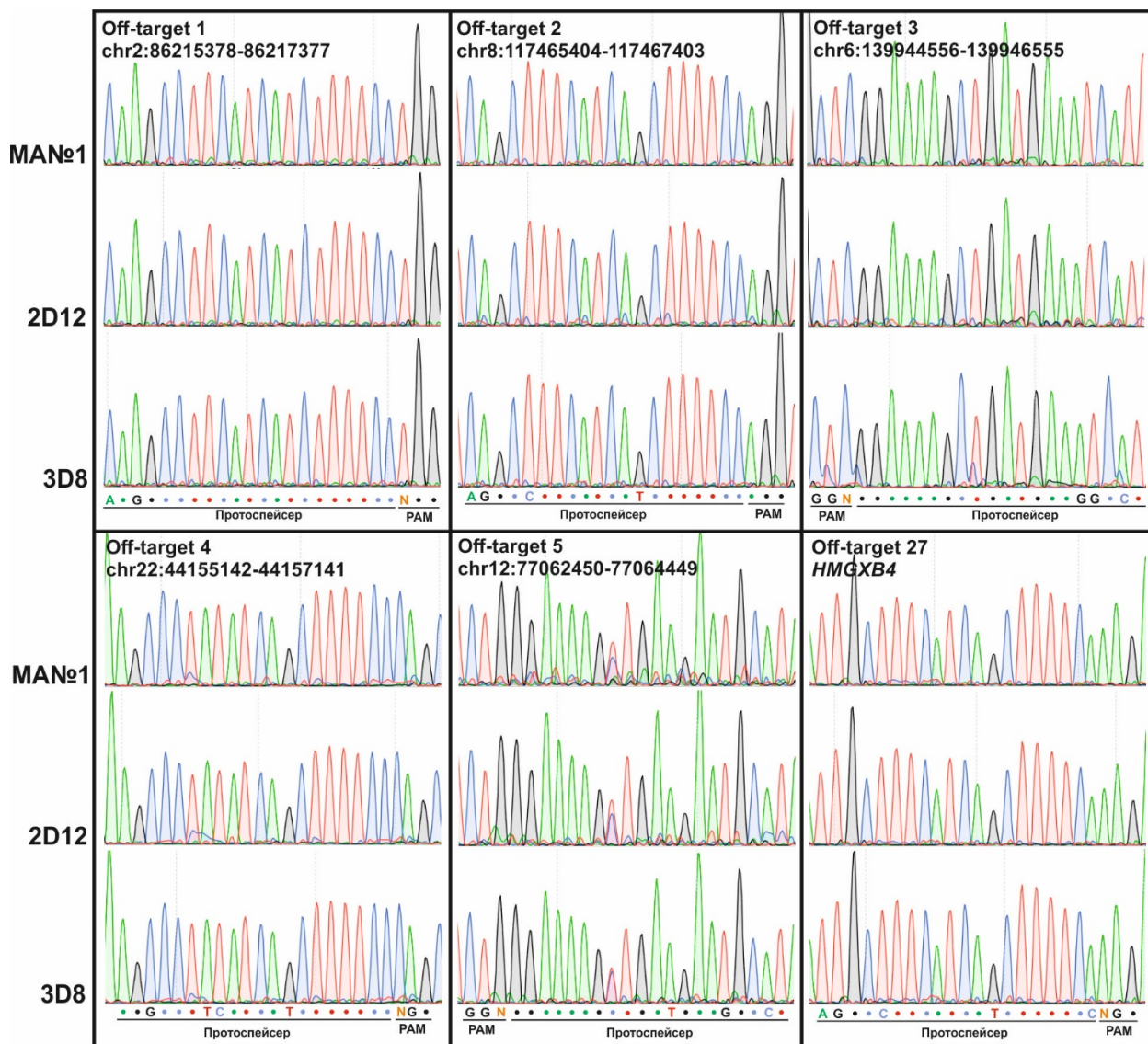


Рисунок 8. Результаты проверки внесения двунитевых разрывов системой CRISPR/Cas9 в нецелевых локусах генома клеток MAN $\text{\#}1$, 2D12 и 3D8 с помощью секвенирования по Сэнгеру.

На рисунке 8 представлены секвенограммы нецелевых сайтов в геноме каждой из исследованных линий клеток. Под каждым из 6 нецелевых сайтов представлен целевой протоспейсер, при этом точками обозначены совпадения нуклеотидов, буквами – замены. Стоит отметить, что сайт off-target 1 отличался всего на 2 нуклеотида от целевого протоспейсера, при этом замены находились в 5'-

конце последовательности, что делало этот сайт наиболее подверженным риску нецелевого разрыва.

В случае гидролиза нецелевого сайта на секвенограмме должны были детектироваться двойные пики – результат негомологичного соединения концов при репарации двунитевых разрывов ДНК. Так, было показано, что все последовательности сохранились интактными (Рисунок 8) в каждой из исследованных линий клеток. Это указывало на специфическую активность выбранного спейсера системы CRISPR/Cas9 в локусе *HTT*.

2.3. Определение числа повторов CAG в первом экзоне гена *HTT* в клонах 2D12 и 3D8

Для определения числа триплетов CAG в гене *HTT* был использован капиллярный электрофорез флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР. После электрофореза на графике, полученном с помощью программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems), где каждый пик соответствует одному триплету CAG. При подсчете пиков прибавляли к полученному числу 3, поскольку обратный праймер содержал в своей последовательности 3 CAG-повтора. Первый наиболее выраженный пик соответствует числу повторов в одном аллеле, второй – в другом аллеле. Так, было показано, что исходная линия фибробластов МАН^{№1} содержит 22 и 20 повтора CAG в аллелях *HTT*. Клон 2D12 содержит 69 повторов CAG в одном аллеле и 20 повторов во втором аллеле, клон 3D8 – 40 и 53 повтора (Рисунок 9). Стоит отметить, что пики, соответствующие 69 триплетам CAG, имеют небольшую высоту по сравнению с пиками для нормального числа триплетов. Это связано со снижением эффективности амплификации удлиненного тракта триплетов CAG с увеличением числа триплетов (Zhao et al., 2017). Таким образом, были получены клоны клеток как с одним мутантным аллелем *HTT*, который является основным генотипом БХ, так и с двумя мутантными аллелями.

Пациенты, несущие два мутантных аллеля, встречаются очень редко. Известно, что у гомозигот возраст появления симптомов примерно тот же, что и у гетерозигот с таким же числом повторов. Однако, клинические симптомы у гомозигот проявляются сильнее – быстрее возникают моторные, когнитивные и поведенческие нарушения. Соответственно, гомозиготность влияет на фенотип и

скорость прогрессирования заболевания, и, возможно, механизмы, лежащие в основе начала появления симптомов и прогрессирования заболевания при БХ, могут различаться (Squitieri et al., 2003). Таким образом, полученные изогенные клоны клеток с гомо- и гетерозиготной мутацией могут быть использованы как модели для изучения этого явления.

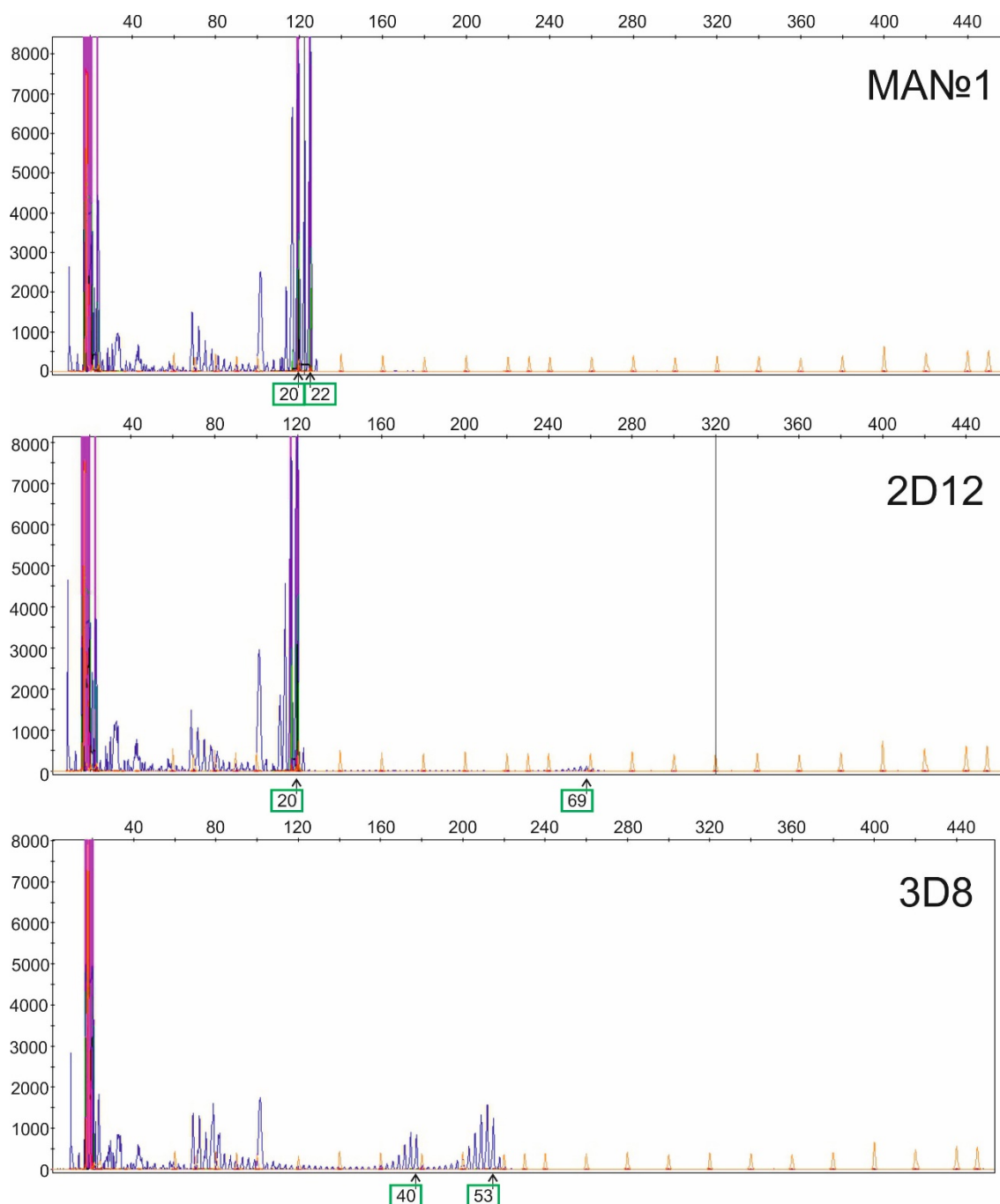


Рисунок 9. Фрагментный анализ продуктов ПЦР с помощью капиллярного электрофореза. Зелеными квадратами и стрелками обозначено число CAG-повторов в аллелях *HTT*. Данные любезно предоставлены к.б.н. Абрамычевой Н.Ю.

2.4. Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов человека с удлинённым трактом *CAG* в гене *HTT*

Для получения ИПСК из клонов фибробластов 2D12 и 3D8 был использован ранее описанный протокол репрограммирования с помощью эписомных векторов, которые не интегрируются в геном и обеспечивают временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности *OCT4*, *KLF4*, *L-MYC*, *SOX2* и *LIN28* (Okita et al., 2011). В процессе репрограммирования эписомы естественным образом элиминируются при делении клеток, и далее в поддержании плюрипотентности и самообновления клеток участвуют активированные эндогенные факторы плюрипотентности.

Эписомы были доставлены в клетки с помощью электропорации. Через 24 ч после трансфекции наблюдалось свечение GFP, подтверждающее успешную доставку ДНК в клетки (Рисунок 10А). Примерно на 5-6 день культивирования после трансфекции наблюдалось изменение морфологии фибробластов – клетки становились округлыми и формировали небольшие скопления (Рисунок 10Б). На второй неделе культивирования становилось больше компактных групп клеток, которые формировали так называемые колонии первичных ИПСК (Рисунок 10В).

На 3 неделе крупные первичные колонии ИПСК с наиболее ярко выраженной ЭСК-подобной морфологией механически переносили на слой ЭФМ. В результате репрограммирования эмбриональных фибробластов человека 2D12 и 3D8 было получено 34 и 21 первичные линии соответственно. Полученные линии клеток интенсивно пролиферировали, колонии имели плоскую однослойную морфологию, и клетки экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу (Рисунок 10Г).

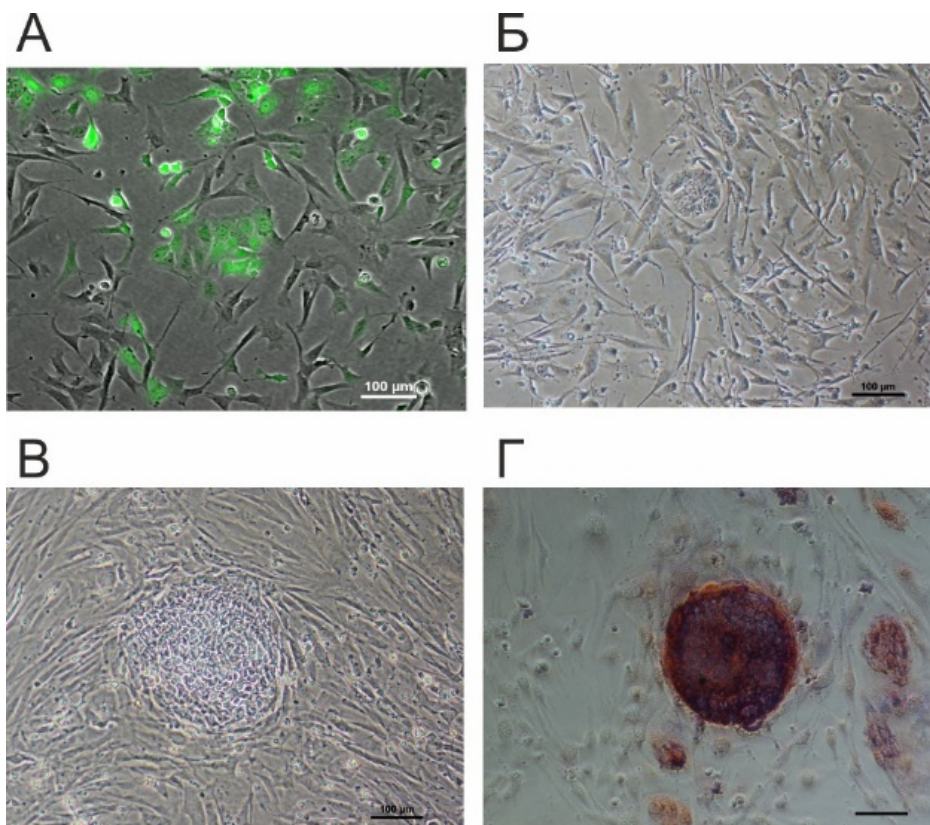


Рисунок 10. Репрограммирование клонов эмбриональных фибробластов человека 2D12. (А) Фибробласты через 24 ч после трансфекции эписомных векторов. Совмещение: фазовый контраст и зеленый канал (свечение белка GFP, экспрессирующегося с эписомного вектора pCE-GFP); (Б) Изменение морфологии клеток на 5-6 день после трансфекции; (В) Морфология первичной колонии ИПСК через 2 недели после трансфекции; (Г) Колония ИПСК, полученных из пациент-специфичных, демонстрирующая экспрессию щелочной фосфатазы.

Прежде чем начать характеристику плюрипотентного статуса полученных линий клеток, требовалось повторное подтверждение наличия точной встройки удлиненного тракта повторов. Этот шаг был необходим, поскольку клетки рассаживали по 4 клетки на лунку, и, следовательно, клоны фибробластов могли являться смешанной популяцией клеток. Для этого был проведен стандартный ПЦР-анализ всех полученных линий ИПСК на встройку мутации в *HTT*. Далее, клоны с подтвержденной встройкой секвенировали как было описано ранее. По результатам проведенных скринингов наличие целевой встройки было подтверждено в 11 и 2 линиях ИПСК, полученных из клонов 2D12 и 3D8, соответственно.

3. Характеристика ИПСК с мутацией в гене *HTT*

3.1. Карiotипирование полученных ИПСК с мутацией в гене *HTT*

При отборе рекомбинантных клонов фибробластов и далее в процессе репрограммирования полученные клетки претерпели множество циклов деления и десятки пассажей, в результате чего могло произойти накопление хромосомных нарушений, и карiotип полученных ИПСК мог значительно измениться (Martins-Taylor & Xu, 2012). Поэтому первым этапом характеристики клеток был анализ карiotипа.

Для анализа были выбраны 3 линии ИПСК 69Q-3T, 69Q-9T и 69Q-25L, полученные из клона 2D12, и 2 линии ИПСК 40/53Q-2L и 40/53Q-9L, полученные из клона 3D8. Линия 40/53Q-2L демонстрировала наиболее нестабильный карiotип – на 13 пассаже практически все клетки являлись полиплоидными. Поэтому эту линию ИПСК исключили из дальнейших экспериментов. Линии ИПСК 69Q-3T (25 пассаж), 69Q-9T (16 пассаж), 69Q-25L (24 пассаж), 40/53Q-9L (12 пассаж) демонстрировали карiotип, близкий к норме – 59%, 75%, 78% и 70% клеток соответственно имели карiotип 46, XY (Рисунок 11).

Таким образом, линии 69Q-3T, 69Q-9T, 69Q-25L и 40/53Q-9L могут быть в последующем охарактеризованы и использованы для моделирования БХ *in vitro*.

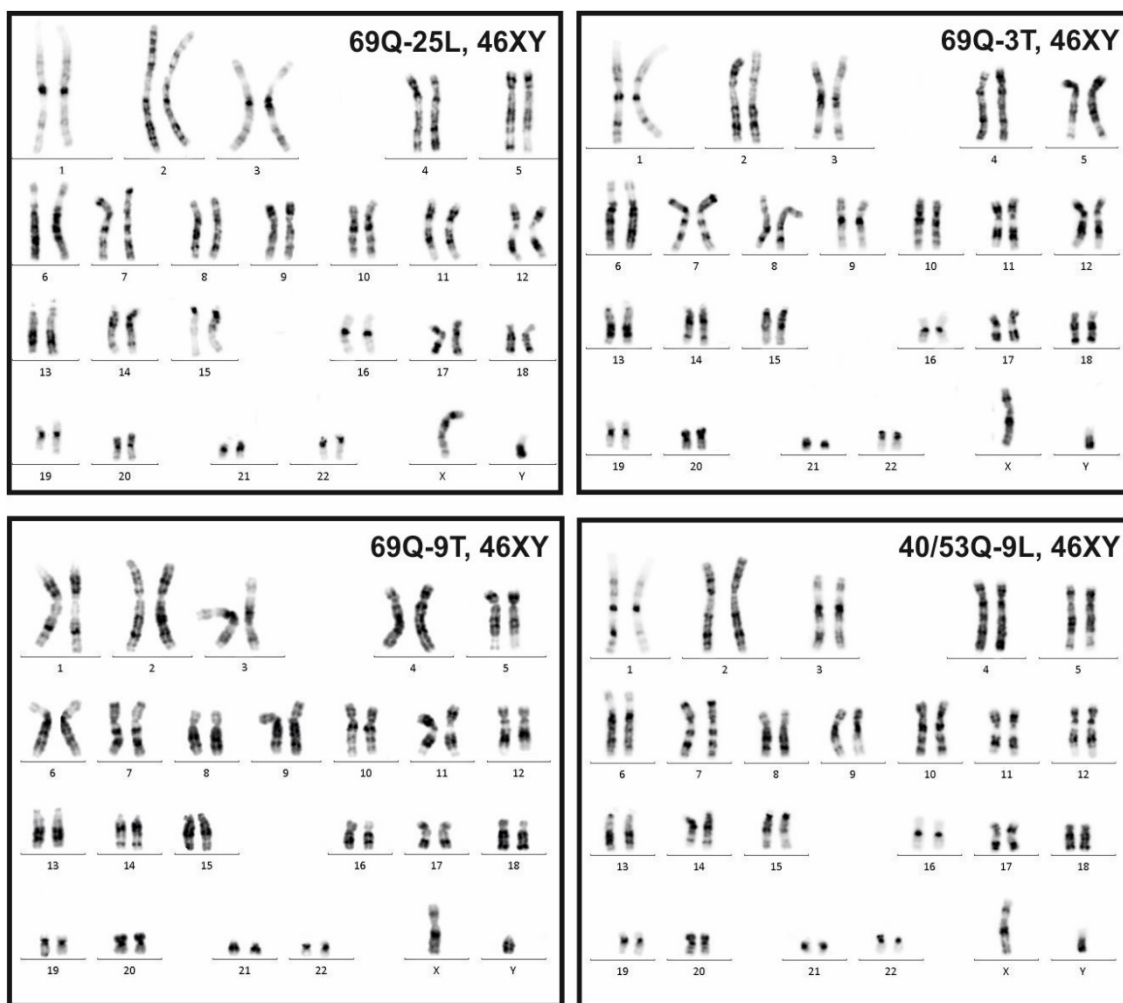


Рисунок 11. Кариотип линий ИПСК 69Q-25L, 69Q-3T, 69Q-9T и 40/53Q-9L. Данные любезно предоставлены к.б.н. Мининой Ю.В.

3.2. Анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности и самообновления

В обширной системе регуляции поддержания самообновления и плюрипотентности клеток центральное место занимают транскрипционные факторы OCT3/4, SOX2 и NANOG, и подтверждение повышенной экспрессии этих факторов является одной из важнейших характеристик ИПСК.

С помощью количественной ПЦР в реальном времени в линиях ИПСК 69Q-3T, 69Q-25L и 40/53Q-9L была проанализирована экспрессия 3 генов – *NANOG*, *OCT3/4* и *SOX2*. Так, было показано, что маркеры плюрипотентности экспрессируются на высоком уровне во всех линиях ИПСК, и не экспрессируются в исходной линии фибробластов МА№1 (Рисунок 12А).

С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что анализируемые линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, такие как поверхностный антиген TRA-1-60 и транскрипционные факторы NANOG, OCT4 и SOX2 (Рисунок 12Б). Таким образом, двумя разными методиками была подтверждена экспрессия основных генов плюрипотентных стволовых клеток человека в полученных линиях ИПСК.

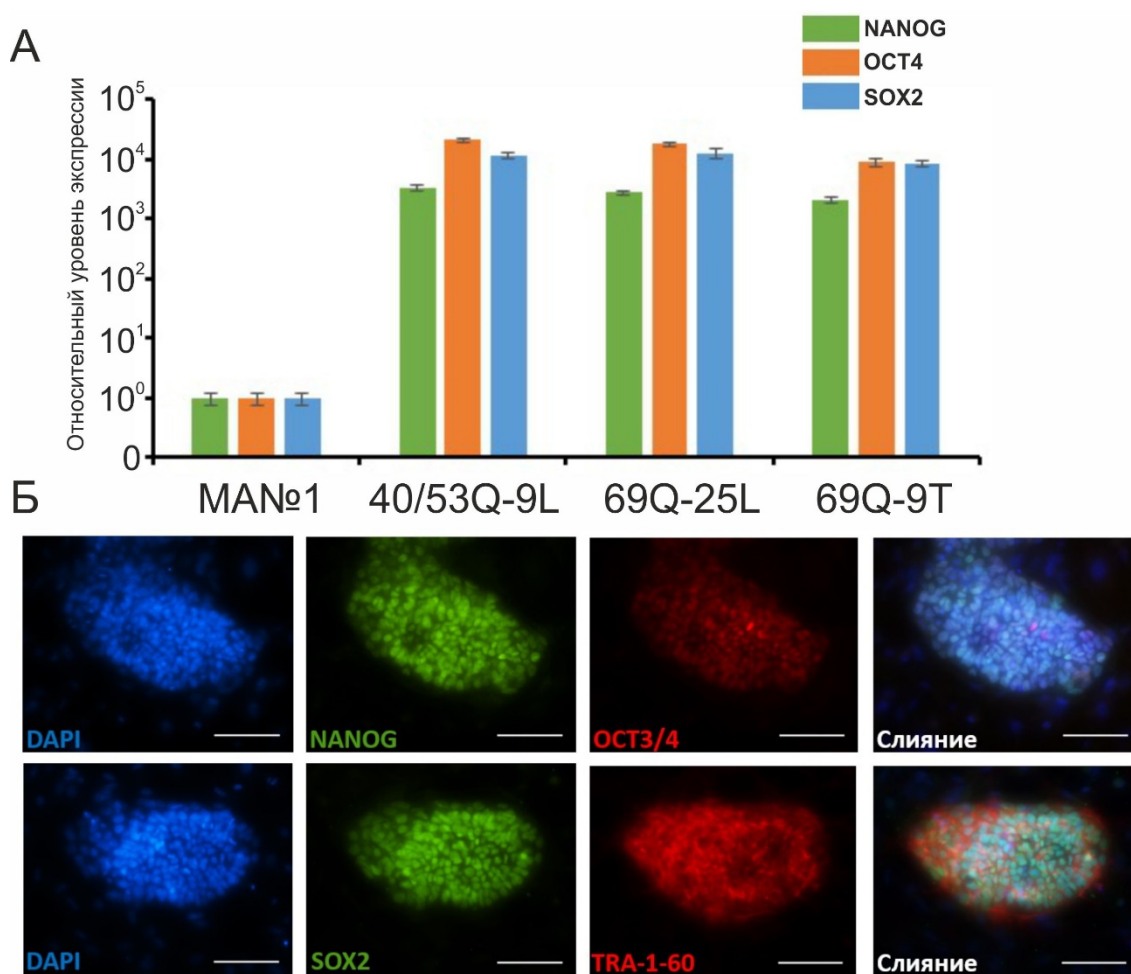


Рисунок 12. Анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании самообновления и плюрипотентности.

(А) Анализ экспрессии маркеров плюрипотентности с помощью количественной ПЦР в реальном времени (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего);

(Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК линии 69Q-9T антителами против транскрипционных факторов OCT3/4, NANOG, SOX2, а также поверхностному антигену TRA-1-60. Шкала – 100 мкм.

3.3. Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*

Одним из важнейших свойств ИПСК является плюрипотентность, т.е. способность давать во время дифференцировки производные трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. Так, в онтогенезе из плюрипотентных клеток может быть полностью сформирован взрослый организм. Таким образом, необходимым этапом в характеристике ИПСК является подтверждение наличия свойства плюрипотентности.

Основной фактор роста фибробластов bFGF (FGF2) играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности, и удаление этого фактора из культуральной среды запускает спонтанную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека. При этом, если клетки культивируются в суспензии, наблюдается образование характерных структур – эмбриоидных телец, внутри которых происходят процессы интенсивной пролиферации и дифференцировки клеток, моделирующих процессы эмбрионального развития *in vivo* (Рисунок 13А).

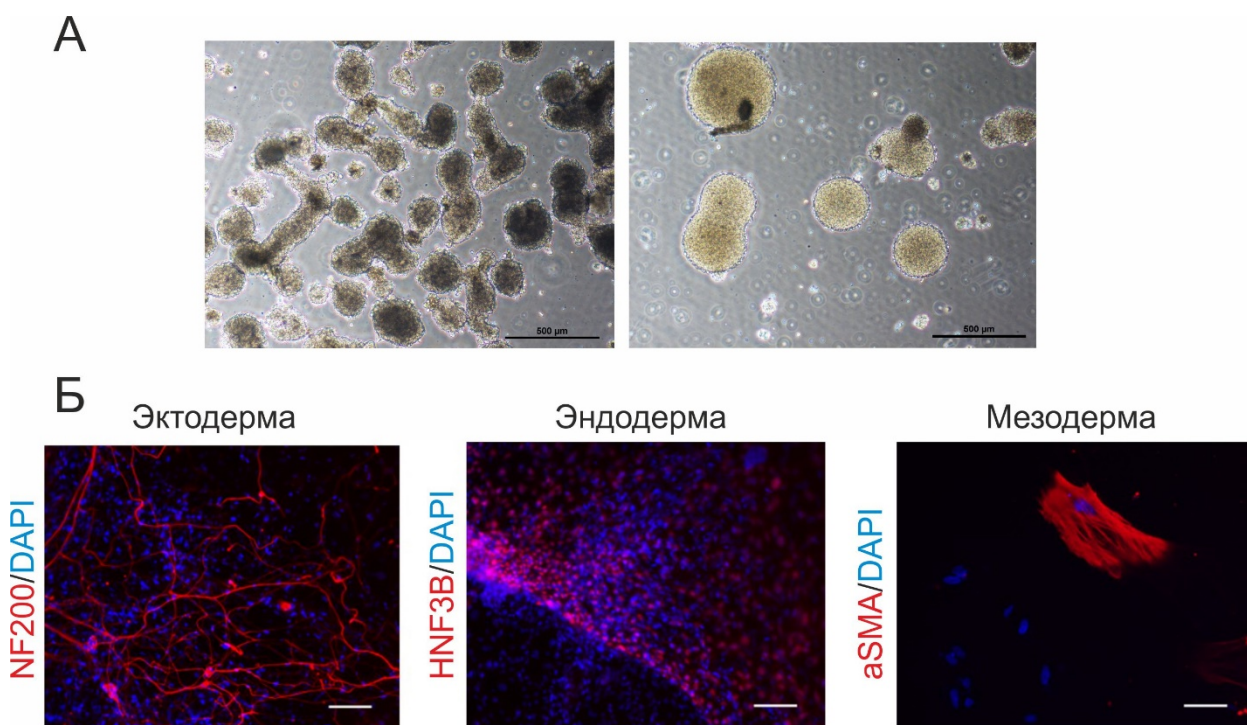


Рисунок 13. Спонтанная дифференцировка ИПСК в системе *in vitro*.

(А) Эмбриоидные тельца, сформированные на 5 день культивирования из ИПСК линии 69Q-9Т, в суспензии в среде без bFGF;

(Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию производных трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке ИПСК 69Q-9Т. Шкала – 100 мкм.

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания образцов после распластывания эмбрионидных телец, полученных при спонтанной дифференцировке всех четырех линий ИПСК, 69Q-3Т, 69Q-9Т, 69Q-25L и 40/53Q-9L, была показана экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков: эктодермы – основного белка цитоскелета нервных клеток NF200; мезодермы – одного из основных элементов сократительного аппарата гладкомышечных клеток α SMA; эндодермы – ядерного фактора гепатоцитов 3В HNF3В (Рисунок 13Б). Таким образом, плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки в системе *in vitro*.

4. Направленная дифференцировка ИПСК с мутацией в гене *HTT* и изогенного контроля в срединные СШН и характеристика мутантного фенотипа полученных нейронов

4.1. Дифференцировка ИПСК с мутацией в гене *HTT* и изогенного контроля в СШН

Нейропатологической особенностью БХ является избирательная потеря СШН стриатума, и детальное изучение патологических механизмов БХ *in vitro* необходимо проводить на этом типе нейронов. Для направленной дифференцировки в СШН были отобраны 4 линии ИПСК – 69Q-3Т, 69Q-9Т, 69Q-25L и 40/53Q-9L, а также изогенный «здоровый» контроль – линия ИПСК iMA-1L, полученная при репрограммировании фибробластов линии МА№1. Более того, для дифференцировки в качестве положительного контроля была использована линия ИПСК 47Q-2Lf, полученная при репрограммировании моноклеарных клеток пациента с 47 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT* (Grigor'eva et al., 2019).

Первый этап нейрональной дифференцировки – двойное SMAD-ингибирование, которое приводит к быстрой нейральной индукции и образованию клеток нейроэктодермы. Это осуществлялось за счет добавления в среду для культивирования ингибиторов SB431542 (ингибитор TGF β сигнального пути) и LDN193189 (ингибитор BMP-сигналинга). Так, клетки активно пролиферировали и образовывали плотный монослой клеток, формирование которого также оказывает стимулирующее воздействие на нейрональную индукцию (Chang et al., 2010). При этом клетки начинали экспрессировать ранние маркеры нейрональных

прогениторных клеток PAX6 и SOX1 (Zhang & Zhang, 2010), а также специфичного маркера конечного мозга OTX2 (Chambers et al., 2009) (Рисунок 15А). Это свидетельствовало об эффективной индукции дифференцировки в нейрональном направлении. Помимо ингибиторов SB431542 и LDN193189 в среду добавляли также морфоген Purmorphamin, который активирует сигнальный путь Hedgehog (El-Akabawy et al., 2011); Dorsomorphin, который в сочетании с SB431542 эффективно усиливает нейрональную индукцию и способствует дифференциации нервных клеток-предшественников (Morizane et al., 2011).

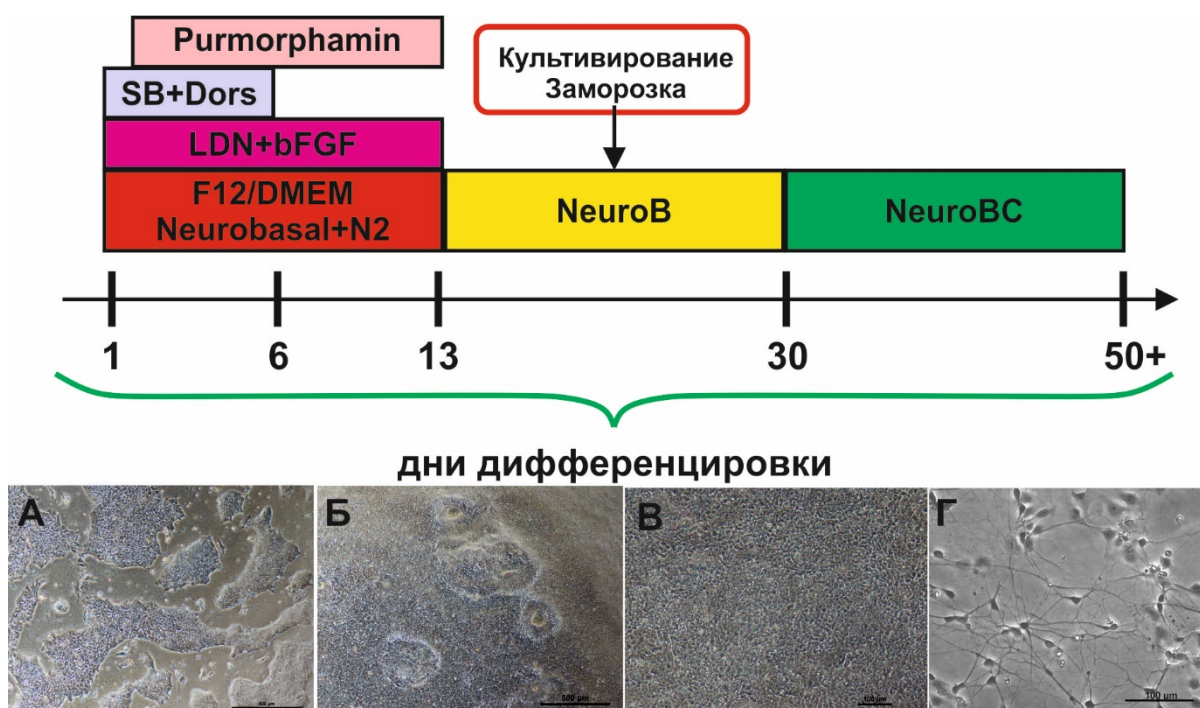


Рисунок 14. Схема дифференцировки ИПСК в СШН. А – ИПСК, Б – клетки нейроэктодермы, В- предшественники СШН, Г – СШН.

Второй этап дифференцировки – созревание и получение интенсивно пролиферирующих клеток-предшественников СШН. Для этого на 13 день дифференцировки клетки пересаживали в соотношении 1:2 и меняли среду на NeuroB, содержащую аскорбиновую кислоту и BDNF. Аскорбиновая кислота играет важную роль в формировании и поддержании микроокружения нейронов, усиливает экспрессию генов, участвующих в нейрогенезе и оказывает нейропротективное действие (Haramoto et al., 2008), а BDNF повышает выживаемость СШН за счет активации антиапоптотических путей (Alcalá-Barraza et al., 2010). Пересадка и смена питательной среды приводили к интенсивной пролиферации клеток-

предшественников СШН, которые способны претерпевать множество пассажей и культивироваться в плотности до 2×10^6 клеток/см² без изменения их свойств (Рисунок 14). Так, клетки нейроэктодермы на 13 день дифференцировки и клетки-предшественники СШН на 40 день культивирования экспрессировали на высоком уровне маркеры нейрональных клеток-предшественников ЦНС *PAX6*, *SOX1* и маркер переднего мозга *FOXP1*, что было показано с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 15Б).

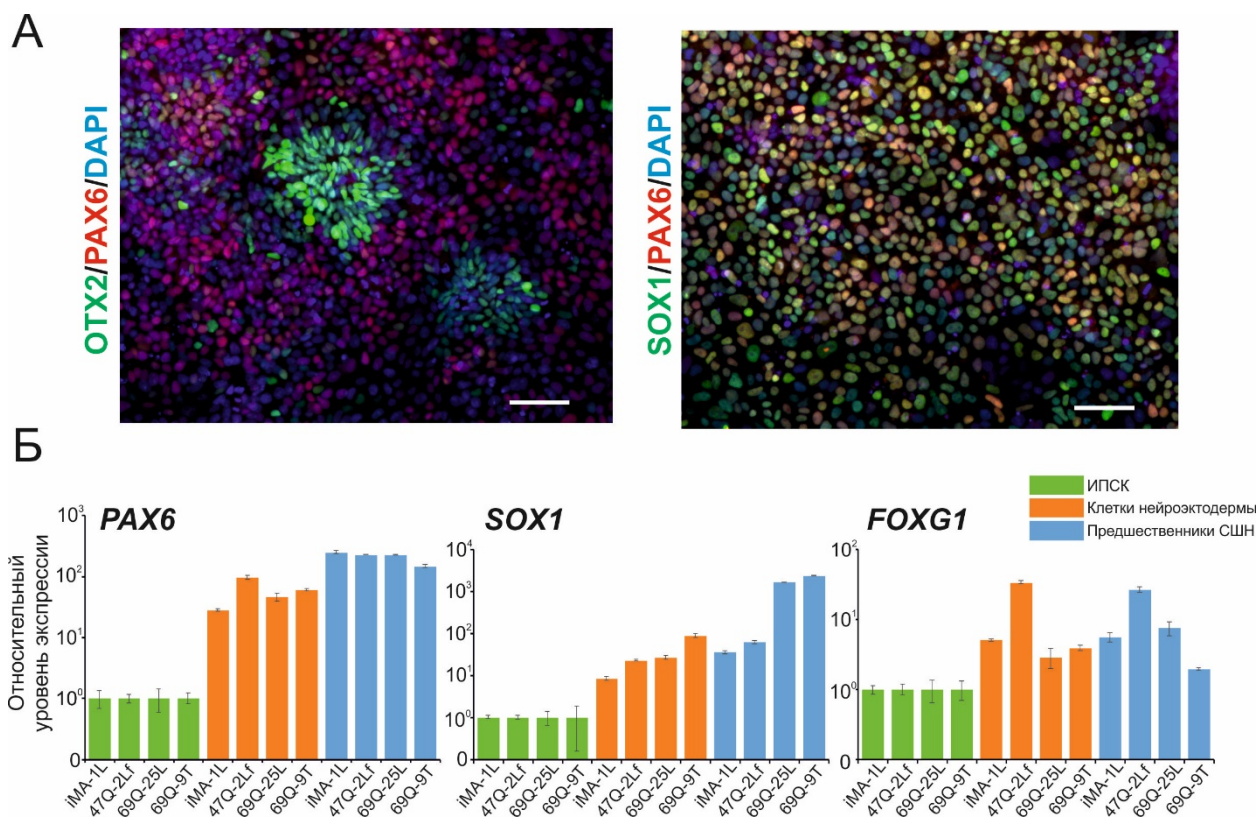


Рисунок 15. Дифференцировка ИПСК в СШН – формирование клеток нейроэктодермы и специализация клеток-предшественников.

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры ранней нейрональной дифференцировки, шкала – 100мкм;

(Б) Анализ относительной экспрессии ранних нейрональных маркеров с помощью количественной ПЦР в реальном времени; нормализация относительно уровня экспрессии в ИПСК (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего).

Линии ИПСК успешно прошли первый этап дифференцировки, кроме линий 69Q-3T и 40/53Q-9L. Клетки этих линий либо приобретали веретенообразную морфологию и затем гибли в процессе культивирования, либо гибли после первой пересадки и перехода на второй этап дифференцировки. Возможно, это связано с

индивидуальными особенностями данных линий ИПСК. Так, многие исследователи наблюдали значительные различия в эффективности дифференцировки разных линий плюрипотентных стволовых клеток человека, которая в высокой степени зависит от паттернов экспрессии генов и метилирования ДНК (Bock et al., 2011).

Таким образом, в результате второго этапа дифференцировки были получены предшественники СШН из ИПСК линий 69Q-9T, 69Q-25L, iMA-1L и 47Q-2Lf.

Последний этап дифференцировки – получение зрелых СШН. Чтобы стимулировать терминальную дифференцировку предшественники СШН пересаживали в редкой плотности – $1,5-2 \times 10^4$ клеток/см². Кроме того, в среду для культивирования NeuroB добавляли такие факторы как цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), который ингибирует проапоптотический сигналинг (Alcalá-Barraga et al., 2010); *дibuтирилциклический* АМФ (дбцАМФ), проникаемый через мембрану аналог циклического АМФ и эффективно индуцирующий дифференцировку в нейроны (Zahir et al., 2009); активин А, который способствует дифференцировке клеток в зрелые СШН (Arber et al., 2015).

В процессе терминальной дифференцировки клетки постепенно прекращали пролиферировать, формировали длинные отростки и связи (Рисунок 14Г, 16). Методом иммунофлуоресцентного окрашивания на 20 день терминальной дифференцировки была показана экспрессия маркера зрелых нейронов MAP2, нейромедиатора СШН – ГАМК (GABA), а также синапсина 1 (SYN1), специфического фосфопротеина нейронов, участвующего в синаптогенезе и регуляции выхода нейромедиатора в синаптическую щель (Рисунок 16А).

С помощью количественной ПЦР в реальном времени был подтвержден высокий уровень экспрессии генов *MAP2*; *SYP*, кодирующего пресинаптический маркер синаптофизин; *GAD1*, кодирующего глутамат декарбоксилазу 1, которая синтезирует ГАМК (Рисунок 16Б).

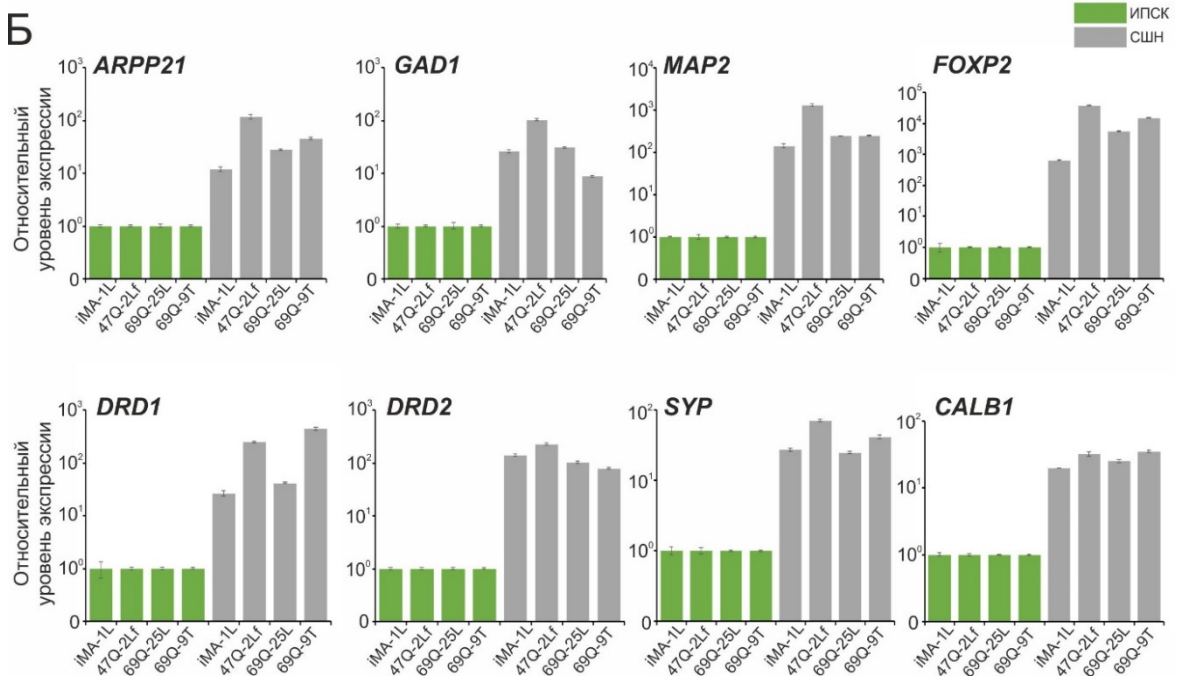
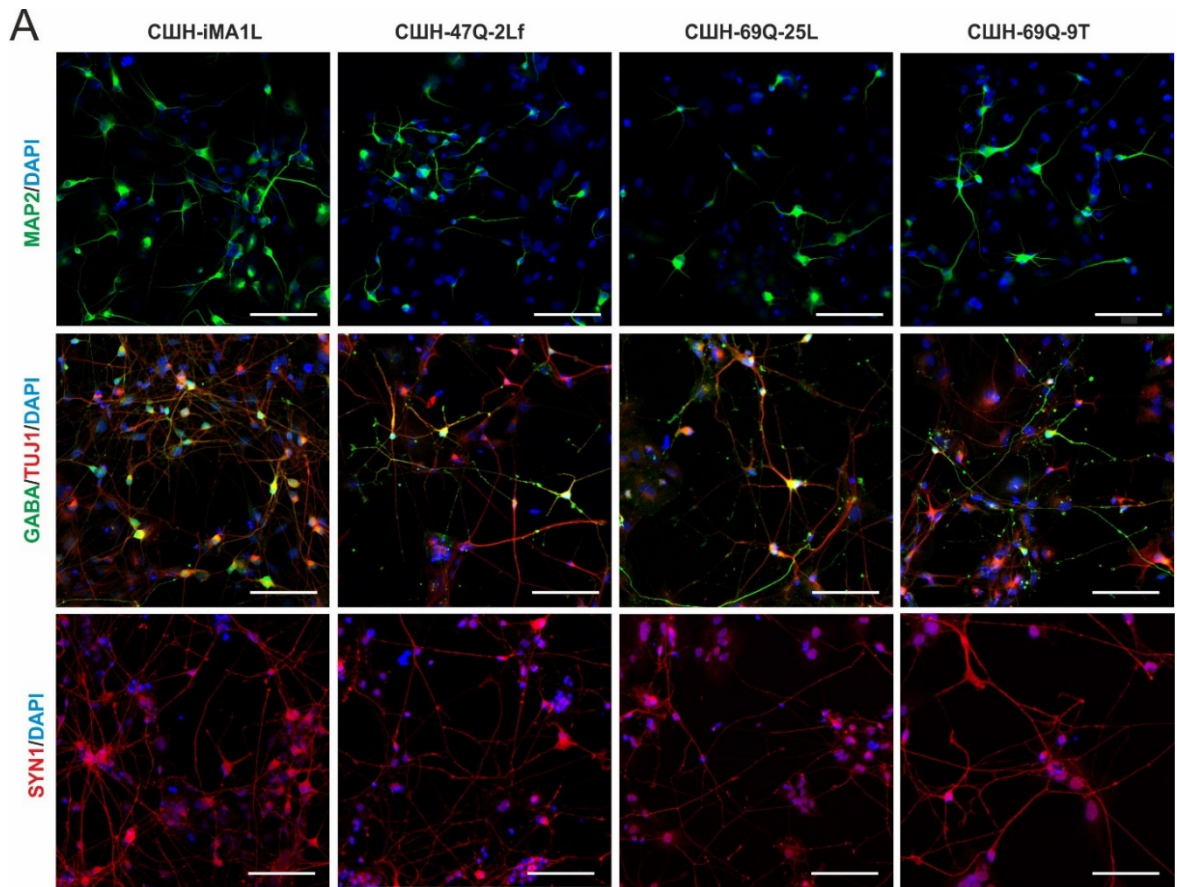


Рисунок 16. Терминальная дифференцировка в СШН.

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание нейронов на маркеры зрелых СШН, шкала – 100 мкм;

(Б) Анализ относительной экспрессии маркеров СШН с помощью количественной ПЦР в реальном времени; нормализация относительно уровня экспрессии в ИПСК (n=3, значения

для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

Также на стадии зрелых нейронов была показана экспрессия генов-маркеров нейронов стриатума *ARPP21* (играет центральную роль в интеграции ключевых сигналов нейромедиаторов на СШН посредством регуляции кальмодулин-зависимой киназы I и протеин-фосфатазы-2B), *CALB1* (кальбиндин, один из основных кальций-связывающих и буферных белков, играет важную роль в предотвращении гибели нейронов, а также в поддержании гомеостаза кальция), *FOXP2* (транскрипционный фактор, участвует в положительной регуляции дифференцировки СШН из клеток латерального ганглионарного бугорка, и в отрицательной регуляции формирования интернейронов из клеток дорсального медиального ганглионарного бугорка, через взаимодействие с сигнальным путем Hedgehog), *DRD1* и *DRD2*, которые являются главными типами дофаминовых рецепторов в стриатуме и, соответственно, разделяют популяцию СШН стриатума на две субпопуляции – D1- и D2-СШН (Рисунок 16Б).

4.2. Анализ нейронов на наличие агрегатов мутантного хантингтина

Ядерные и цитоплазматические включения мутантного хантингтина в нейронах являются отличительным признаком БХ (Arrasate & Finkbeiner, 2012). Поэтому одним из первых анализов для исследования патологического фенотипа полученных нейронов было выявление белковых агрегатов в клетках с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием антител против хантингтина (N-конец) и полиглутаминовых повторов (polyQ; связывается с белками, содержащими от 39 полиглутаминовых остатков). Однако, в результате данного анализа не было выявлено хантингтин- или polyQ-позитивных агрегатов ни в клетках с внесенной мутацией в *HTT*, ни в пациент-специфичных нейронах. Цитоплазма и отростки всех исследованных нейронов равномерно окрашивались на хантингтин, а ядра – на полиглутаминовые повторы (Рисунок 17). Кроме того, были выявлены цитоплазматические polyQ-позитивные включения, не окрашенные антителами против хантингтина. Вероятно, это является результатом связывания анти-polyQ с другими белками, содержащими в норме 39 и более глутаминовых

остатков. К таким белкам относятся атрофин-1, атаксин-1 и атаксин-3, PPP2R2B и ТАТА-связывающий белок (Adegbuyiro et al., 2017).

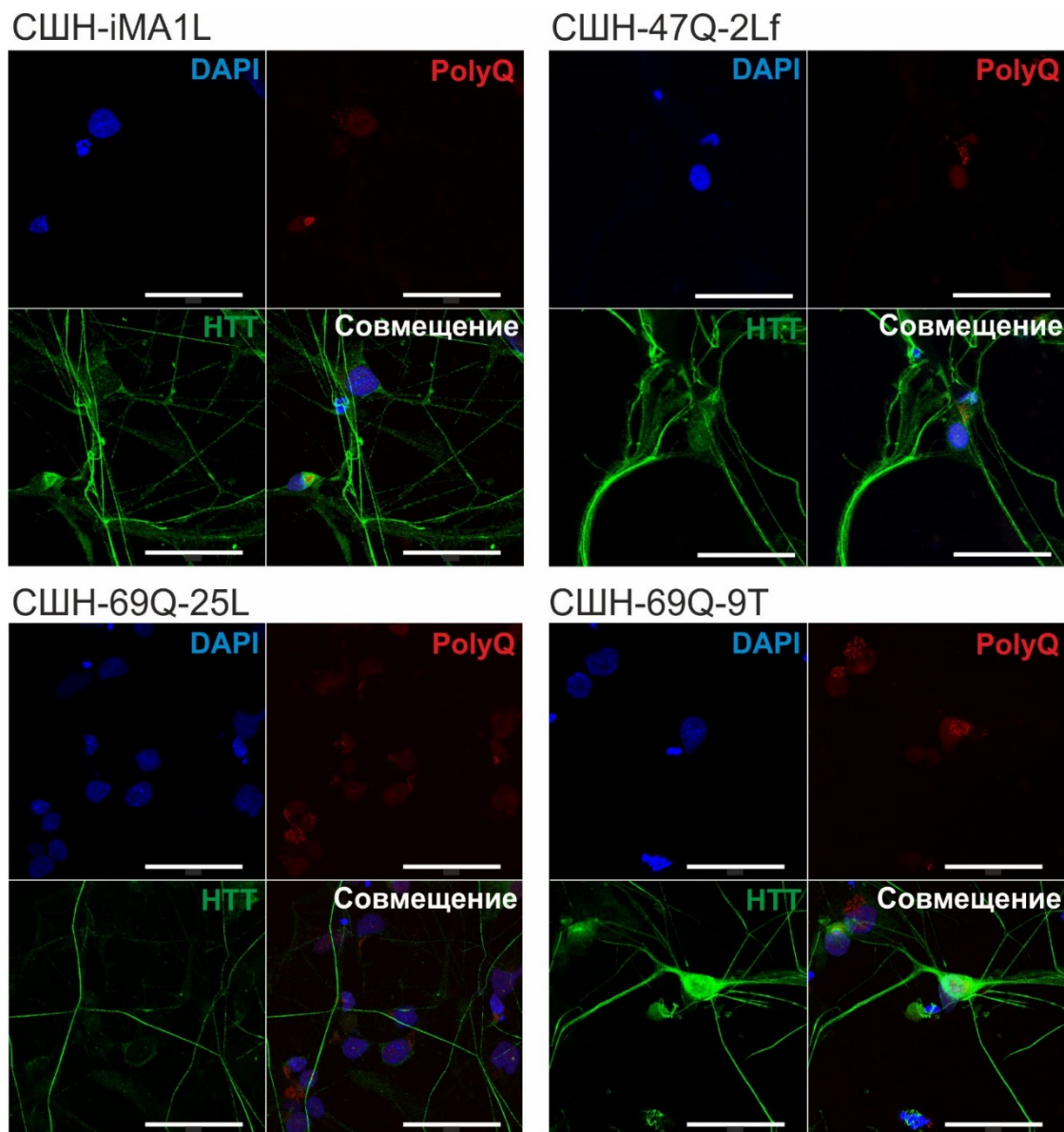


Рисунок 17. Иммунофлуоресцентный анализ нейронов на наличие агрегатов мутантного хантингтина. Шкала – 50 мкм.

Полученные результаты в целом соответствует данным многих исследовательских групп, изучавшим нейроны, дифференцированные из пациент-специфичных ИПСК (The HD iPSC Consortium, 2012; An et al., 2012; Jeon et al., 2012; Nekrasov et al., 2016). Эти нейроны не проявляли явных нейропатологических изменений, выживаемость клеток снижалась лишь после воздействия агентами, вызывающими эксайтотоксический или окислительный стресс. Кроме того, агрегаты мутантного хантингтина появлялись только после продолжительного

культивирования *in vitro* или *in vivo* (более 6 месяцев) или воздействия ингибиторами протеасом (Jeon et al., 2012; Nekrasov et al., 2016). Таким образом, поздняя манифестация БХ делает возраст особенно важным фактором, который должен быть соответствующим образом отражен в модели.

Одной из возможных причин довольно слабого проявления патологического фенотипа в нейронах, полученных из ИПСК, может быть процесс репрограммирования, когда клетки теряют «возрастные» эпигенетические модификации и снова приобретают эмбриональный фенотип. В недавних работах было показано, что возраст-зависимый фенотип БХ лучше воспроизводится стриарными СШН, полученными при непосредственной трансдифференцировке пациент-специфичных фибробластов (Victor et al., 2014, 2018).

4.3. Влияние мутации на ультраструктурную организацию нейронов

Известно, что мутантный хантингтин оказывает токсический эффект на множество клеточных процессов задолго до начала образования агрегатов хантингтина и появления симптомов заболевания (Panov et al., 2002), и исследование ультраструктурной организации нейронов с мутацией позволяет выявить ранние нейропатологические особенности БХ.

Согласно электронномикроскопическому исследованию, проведенному Сульдиной Л.А., число шипиков на дендритах мутантных СШН как пациент-специфичных, так и линий с внесенной мутацией в ген *HTT*, увеличено по сравнению с контролем, появляются необычные шипики – длинные и тонкие (Рисунок 18Г, Е). Также в культуре мутантных нейронов было выявлено большое число дефектных синапсов: пресинаптические окончания со светлым пустым пространством и с атипично расположенными синаптическими пузырьками разного размера (Рисунок 18Ж). Более того, в нейронах СШН-47Q-2Lf и СШН-69Q-25L были обнаружены митохондрии с измененной морфологией, встречались необычно крупные и разветвленные митохондрии (Рисунок 18Д, З).

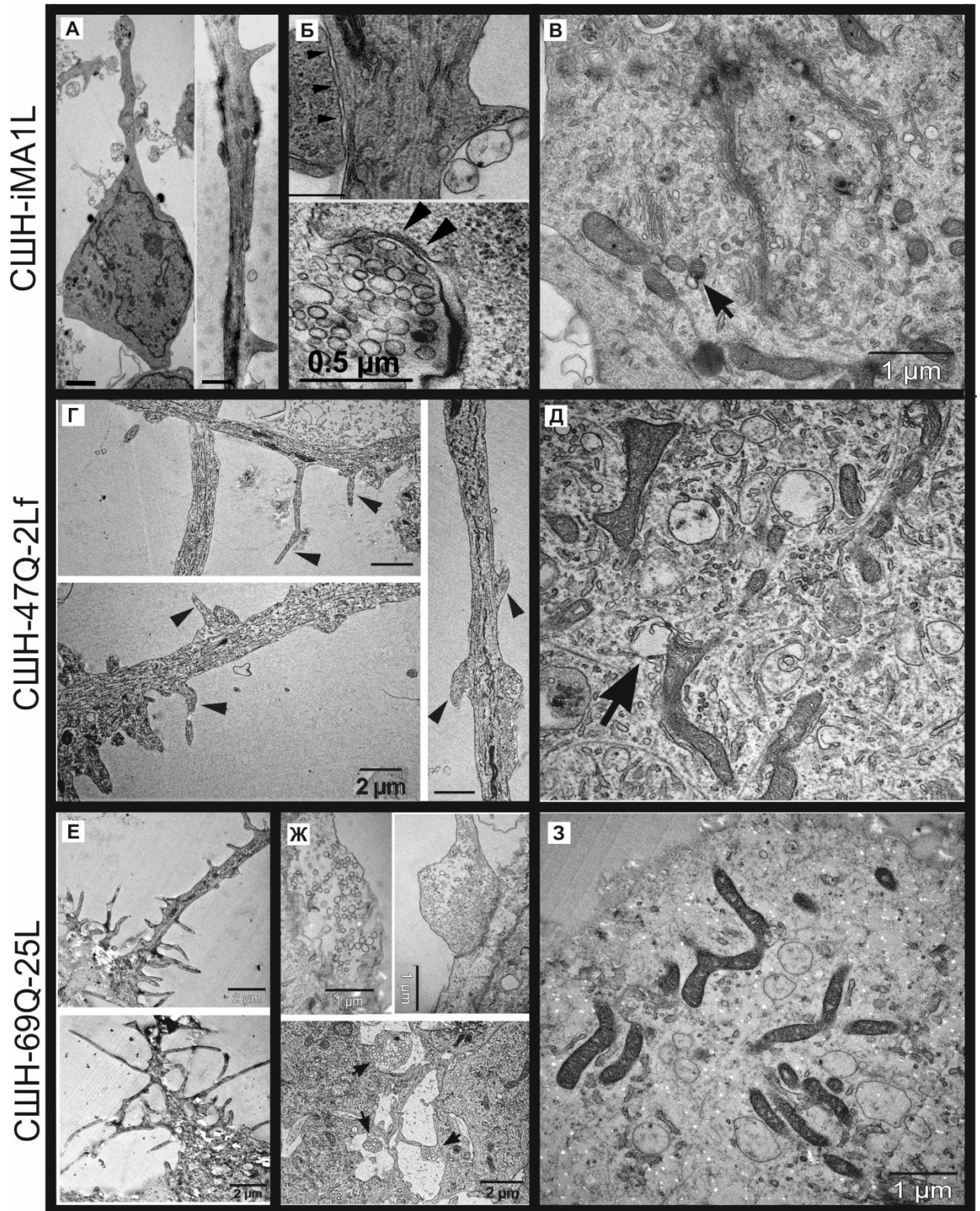


Рисунок 18. Ультраструктурные нарушения в мутантных СШН.
 (А, Г, Е) Морфология и шипики. Стрелками обозначены шипики;
 (Б, Ж) Синапсы. Стрелками обозначены синапсы;
 (В, Д, З) Митохондрии. Стрелками обозначена митофагия.
 Электронномикроскопические фотографии любезно предоставлены Сульдиной Л.А.

Известно, что морфологические изменения дендритов и шипиков СШН наблюдаются на средней и поздней стадиях БХ. Эти изменения могут характеризоваться пролиферативными либо дегенеративными изменениями. Проллиферативные изменения включают сильный изгиб дистальных сегментов дендритов, ветвление коротких сегментов и увеличенную плотность шипиков по длине дендрита и размер шипиков. Дегенеративные изменения включают укорочение дендритов, случайные очаговые вздутия дендритов и сильную потерю шипиков. Проллиферативные изменения наблюдаются преимущественно на средней стадии развития БХ, в то время как дегенеративные изменения наблюдаются на поздней стадии БХ (Ferrante et al., 1991). Таким образом, наблюдаемые морфологические изменения нейронов с мутацией согласуются с литературными данными, и возможно, исследованные нейроны находились на «средней» стадии развития заболевания, когда происходят пролиферативные изменения.

Появление дефектных синапсов возможно связано с нарушением аксонального транспорта, которое наблюдается при БХ. Это явление было ранее обнаружено с помощью ультраструктурных исследований, когда показали уменьшение количества синаптических пузырьков и аномальные профили мембранных органелл в аксонах пораженных нейронов (Li, 1999; Li et al., 2001; Li & Li, 2004). Таким образом, дефицит аксонального транспорта может представлять собой серьезное нейропатологическое событие, лежащее в основе избирательной гибели СШН стриатума и нейронов коры при БХ.

Митохондрии являются основными производителями энергии в нейронах, и изменения в функционировании, строении митохондрий и в митофагии (процесс переработки поврежденных и стареющих митохондрий с помощью лизосомального аппарата) приводят к нарушениям энергетического обмена и усилению окислительного стресса, что в конечном итоге приводит к дисфункции нейронов и их гибели при БХ. Необычно крупные и разветвленные митохондрии в мутантных нейронах вероятно связаны с нарушением процессов деления и слияния митохондрий, в которых хантингтин играет немаловажную роль (Costa & Scorrano, 2012).

Выявленные качественные патологические изменения в целом воспроизводят мутантный фенотип нейронов при БХ. Таким образом, мутация, внесенная в геном

клеток с помощью системы CRISPR/Cas9 и вызывающая БХ, действительно оказала негативный эффект на клеточные процессы и, соответственно, на ультраструктурную организацию нейронов в период до начала формирования белковых агрегатов.

4.4. Сравнение эффективности формирования нейральных розеток

В ряде исследований указывается, что хантингтин необходим для нормального развития мозга (Sardo et al., 2012; Nguyen et al., 2013; Haremakı et al., 2015). Недавние исследования показали, что мутантный хантингтин нарушает специализацию и созревание стриарных СШН, а также деление предшественников клеток коры и нейрогенез, путем нарушения регуляции ориентации митотического веретена. (Molero et al., 2009; Molina-Calavita et al., 2014). Кроме того, выявлены электрофизиологические нарушения, дискретные структурные изменения мозга, изменения его объема, а также когнитивные и моторные нарушения, возникающие задолго до появления симптомов БХ (Nopoulos et al., 2010; Tabrizi et al., 2013; Paulsen et al., 2014). Дополнительно, исследования *in vitro* показали, что у пациент-специфичных ИПСК нарушена способность при дифференцировке формировать нейральные розетки – совокупность радиально расположенных столбчатых клеток, которые экспрессируют многие белки-маркеры нейроэпителиальных клеток нервной трубки, и являются источниками развития нейральных предшественников в культурах дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток (Jeon et al., 2012; Xu et al., 2017).

В соответствии с этими исследованиями была проведена дифференцировка ИПСК линий iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T в нейральные розетки через этап формирования эмбрионных телец и культивирования в среде для нейральной индукции, содержащей такие факторы как N2 и bFGF.

После распластывания эмбрионных телец наблюдалось формирование заметно менее развитых и небольших по размеру нейральных розеток как в пациент-специфичной линии 47Q-2LF, так и в линиях 69Q-25L и 69Q-9T, в то время как клетки изогенной контрольной линии iMA-1L формировали крупные и хорошо развитые нейральные розетки (Рисунок 19). Вероятно, это нарушение

действительно является следствием мутации и не связано с различиями в генетическом фоне.

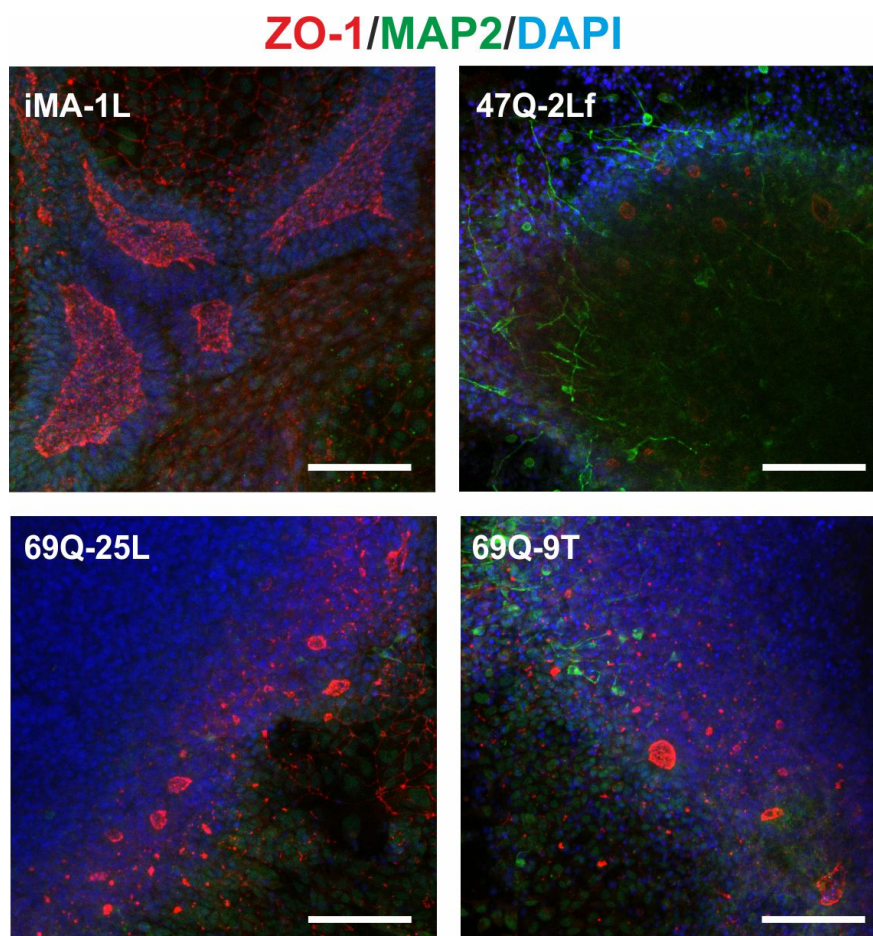


Рисунок 19. Оценка формирования нейральных розеток после нейральной индукции iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T. Окрашивание на MAP2 (зеленый), маркер нейронов, и ZO-1 (красный), маркер люминальных розеток. Результаты были воспроизведены в трех независимых экспериментах. Шкала – 100 мкм.

Таким образом, нарушение формирования нейральных розеток, которые воспроизводят нейрогенез *in vitro*, при дифференцировке как пациент-специфичных ИПСК, так и ИПСК с внесенной мутацией, является подтверждением приведенных выше данных о раннем влиянии мутантного хантингтина на развитие нервной системы.

4.5. Дифференциальная чувствительность клеток-предшественников СШН к отсутствию факторов роста

Каспаза-3 является ключевым медиатором апоптоза нейронов при развитии множества нейродегенеративных заболеваний (Khan et al., 2015). Более того, у

пациентов с БХ повышается активность каспазы-3 в лимфообластах (Maglione et al., 2006), а также при стрессовых воздействиях – инкубирование лимфобластов с цианидом, культивирование нейральных стволовых клеток в среде без факторов роста (Squitieri et al., 2011; An et al., 2012; Xiaohong Xu et al., 2017). Поэтому, еще одним этапом подтверждения проявления патологического фенотипа была проверка дифференциальной чувствительности мутантных клеток, а именно предшественников СШН, к отсутствию факторов роста.

Предшественники СШН, полученные при дифференцировке ИПСК линий iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T, инкубировали в течение 24 ч в среде без фактора роста BDNF, затем оценивали активность каспазы-3 с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Действительно, было обнаружено значительное увеличение активности каспазы-3 в мутантных предшественниках 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T при депривации фактора роста по сравнению с контролем (Рисунок 20). Напротив, мутантные предшественники не показали значимых различий увеличения активности каспазы-3 при сравнении друг с другом. Стоит отметить, что во всех линиях мутантных предшественников СШН, а также в контрольной линии клеток, наблюдалось значимое увеличение числа каспаза-3-позитивных клеток при отмене фактора роста BDNF.

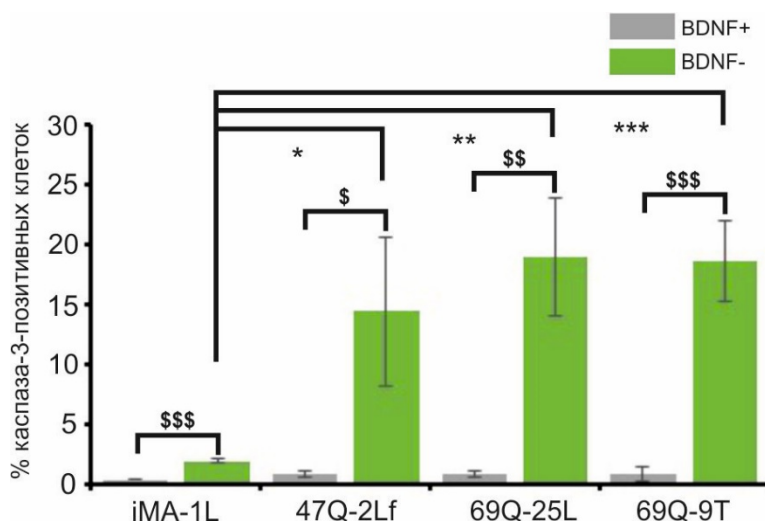


Рисунок 20. Повышенная чувствительность мутантных предшественников СШН к удалению факторов роста. Гибель клеток оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против активированной каспазы-3 после удаления фактора роста BDNF (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 – сравнение между линиями при отмене BDNF, \$p<0,05, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 – сравнение одной линии до и после удаления BDNF).

Наблюдаемое повышение активности каспазы-3 в предшественниках СШН при депривации факторов роста воспроизвело хорошо охарактеризованный фенотип заболевания, наблюдаемый на различных моделях БХ, и внесение мутации в ген *HTT* способствовало проявлению этого фенотипа. Кроме того, повышенная чувствительность мутантных клеток к удалению факторов роста подтверждает вклад дефицита трофического подкрепления в патогенезе БХ, в частности, нарушение сигналинга BDNF в клетках мозга. Так, *BDNF* не экспрессируется в клетках латерального ганглионарного бугорка (предшественниках стриарных клеток) и в стриатуме. Этот трофический фактор антероградно транспортируется в стриатум от клеток коры головного мозга, черной субстанции *pars compacta*, миндалина и таламуса. Однако, мутантный хантингтин нарушает экспрессию и транспорт BDNF и, тем самым, приводит к пониженной жизнеспособности клеток-предшественников, дисфункции нейронов и атрофии стриатума (Baodyuk & Xu, 2014). Таким образом, при удалении BDNF из культуральной среды значимое снижение жизнеспособности клеток-предшественников контрольной линии (увеличение числа каспаза-3-позитивных клеток в среднем от 0,28% до 1,87%) можно объяснить более узкой специализацией в стриарном направлении, и, вероятно, определенная доля клеток не экспрессирует *BDNF*. Что же касается мутантных предшественников, то здесь значительное изменение жизнеспособности клеток (увеличение числа каспаза-3-позитивных клеток в среднем от 0,8% до 17,3%) наиболее вероятно связано с вышеупомянутым негативным влиянием мутантного хантингтина на сигналинг BDNF.

4.6. Уменьшение уровня N-кадгерина в предшественниках СШН с внесённой мутацией в ген *HTT*

N-кадгерин (нейрональный кадгерин) тесно связан с клеточной адгезией, передачей сигналов, дифференцировкой и функцией синапсов нейрональных клеток (Takeichi, 2007). Известно, что нарушение энергетического метаболизма в нейрональных клетках при БХ влияет на уровень N-кадгерина. Так, в культивируемых стриарных клетках, моделирующих БХ, уровень N-кадгерина уменьшался при недостатке АТФ из-за токсического воздействия мутантного хантингтина на митохондрии (Reis et al., 2011). В исследовании 2012 года также

было показано, что уровни мРНК и белка N-кадгерина были ниже в нейральных стволовых клетках с мутацией в гене *HTT* по сравнению с клетками с исправленной мутацией или от здорового донора (An et al., 2012).

Предшественники СШН с внесенной мутацией в ген *HTT* демонстрировали достоверно более низкий уровень N-кадгерина по сравнению с изогенным контролем (Рисунок 21А, Б). Однако, уровень N-кадгерина в предшественниках СШН, полученных при дифференцировке пациент-специфичной линии ИПСК 47Q-2Lf был значительно выше, чем в неизогенном для них контроле – линии iMA-1L (Рисунок 21А). Такой результат возможно связан с тем, что в гене *HTT* пациент-специфичной линии всего 47 повторов CAG, тогда как сниженный уровень N-кадгерина наблюдали только в клетках со значительно большим числом повторов (≥ 72 CAG) (Reis et al., 2011; An et al., 2012). Еще одной причиной может быть исходно повышенный уровень N-кадгерина специфично в данной линии. Поэтому для точного выявления уменьшения уровня N-кадгерина необходимо исследовать несколько пациент-специфичных линий, чтобы оценить средний уровень этого белка в разных мутантных клетках.

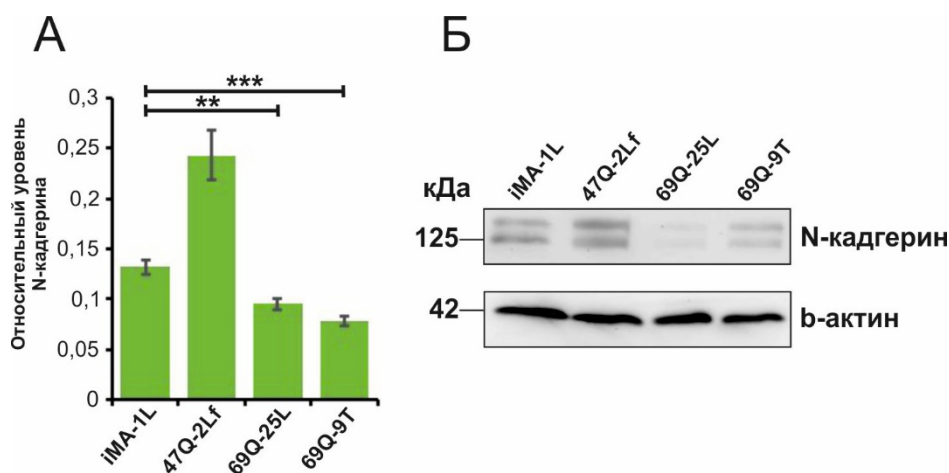


Рисунок 21. Уровень N-кадгерина в предшественниках СШН.

(А) Полуколичественный анализ уровня N-кадгерина с помощью метода вестерн-блот ($n=3$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего, $**p<0,01$, $***p<0,001$ – сравнение между линиями);

(Б) Анализ вестерн-блот экспрессии N-кадгерина в предшественниках СШН.

Таким образом, было показано, что внесение мутации, вызывающей БХ, действительно вызывает развитие специфичного патологического фенотипа –

значимое уменьшение уровня N-кадгерина в предшественниках СШН, и использование изогенных линий клеток позволяет точно это определить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была создана и использована система на основе CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации для внесения мутации, вызывающей БХ, а именно – удлиненного тракта тринуклеотидных повторов CAG в первый экзон гена *HTT*. С помощью тщательного подбора сайта для действия CRISPR/Cas9, а также внесения синонимичной однонуклеотидной замены в последовательность донорной матрицы, удалось обеспечить специфический гидролиз только целевой последовательности геномной ДНК. Внесенная однонуклеотидная замена изменяла канонический PAM для системы CRISPR/Cas9 5'-NGG-3' на неканонический 5'-NAG-3', что тем самым снижало вероятность двунитевых разрывов в этой области. Эта стратегия может быть также применима в тех случаях, когда необходимо внести или, наоборот, исправить точечную мутацию для создания изогенных клеточных моделей заболеваний.

В результате использования разработанной системы для гомологичной рекомбинации в локусе *HTT* было получено двадцать три клональные линии эмбриональных фибробластов человека с удлиненным трактом CAG-повторов в целевом локусе. В двух исследованных линиях была показана экспрессия мутантного хантингина на уровне белка. Далее, эти две линии, одна из которых содержала гетерозиготную встройку повторов, а другая – гомозиготную встройку, были репрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью неинтегрирующихся в геном эписомных векторов, обеспечивших временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности. Плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью общепринятых стандартных тестов – выявление экспрессии маркеров плюрипотентных стволовых клеток с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и количественной ПЦР в реальном времени, а также спонтанная дифференцировка в системе *in vitro*. Для направленной дифференцировки ИПСК в зрелые СШН была использована комбинация нескольких протоколов с модификациями.

Нейроны с мутацией в гене *HTT* демонстрировали мутантный фенотип на ультраструктурном уровне – наблюдались изменения в морфологии клеток, шипиков, синапсов, митохондрий. Мутантные ИПСК демонстрировали

формирование небольших и слабо развитых нейральных розеток при спонтанной нейральной дифференцировке, в то время как клетки изогенного контроля формировали характерные розетки. Более того, предшественники СШН с мутацией в *HTT* имели значительно более низкую выживаемость при удалении BDNF и низкий уровень N-кадгерина по сравнению с изогенным контролем.

Полученная изогенная модельная система может служить основой для изучения молекулярно-генетических основ БХ и скрининга потенциальных лекарств-кандидатов без учета влияния генетического фона. Кроме того, тот факт, что при дифференцировке ИПСК формируются нейроны с эмбриональным фенотипом, делает возможным изучение ранних патологических изменений. Это в свою очередь может позволить проводить превентивную терапию заболевания и, тем самым, не только отсрочить, но также, возможно, вообще избежать появления симптомов болезни.

ВЫВОДЫ

1. Создана система для проведения гомологичной рекомбинации в экзоне 1 гена *HTT*, состоящая из генетической конструкции, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и донорные генетические конструкции, содержащие 69 и 148 триплетов CAG.
2. Эффективность работы созданной системы проверена на клетках линии HEK293FT, в результате чего получено два клона, HEK293-F1 (148Q/148Q) и HEK293-B5 (69Q/ΔHTT), с гомо- и гетерозиготной встройкой удлиненного тракта триплетов CAG, и показана экспрессия мутантного хантингтина с помощью анализа вестерн-блот.
3. С помощью созданной системы получено 23 клон эмбриональных фибробластов человека с мутацией в гене *HTT*.
4. Клоны фибробластов 2D12 (69Q/20Q) и 3D8 (53Q/40Q) были репрограммированы к плюрипотентному состоянию с использованием эписомных векторов, в результате чего было получено 11 и 2 линии ИПСК соответственно.
5. Показано, что полученные линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, при спонтанной дифференцировке в эмбрионидных тельцах образуют типы клеток трех примитивных зародышевых листков и имеют кариотип близкий к норме.
6. В результате направленной дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *HTT* получены нейроны, экспрессирующие гены-маркеры СШН стриатума, такие как *GAD1*, *ARPP21*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и *CALB1*.
7. Мутантные клетки демонстрировали патологический фенотип, наблюдающийся при БХ: нарушенное формирование нейральных розеток, высокая чувствительность к удалению трофических факторов и сниженный уровень N-кадгерина на стадии предшественников СШН, ультраструктурные нарушения терминально дифференцированных СШН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малахова А.А., Сорокин М.А., Сорокина А.Е., Маланханова Т.Б., Мазурок Н.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Использование методов редактирования генома для создания изогенных клеточных линий, моделирующих болезнь Хантингтона *in vitro*. // Гены и клетки. - 2016. - Т. 11. - № 2. - С. 106-113.
2. Adegbuyiro A., Sedighi F., Pilkington A. W., Groover S., Legleiter J. Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. // *Biochemistry*. - 2017. - V. 56(9). - P. 1199–1217.
3. Alcalá-Barraza S. R., Lee M. S., Hanson L. R., McDonald A. A., Frey W. H., McLoon L. K. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. // *J Drug Target*. - 2010. - V. 18(3). - P. 179–190.
4. An M. C., O'Brien R. N., Zhang N., Patra B. N., De La Cruz M., Ray, A., Ellerby L. M. Polyglutamine Disease Modeling: Epitope Based Screen for Homologous Recombination using CRISPR/Cas9 System. // *PLoS Currents*. - 2014. -V. 6, P. 1–19.
5. An M. C., Zhang N., Scott G., Montoro D., Wittkop T., Mooney S., Ellerby L. M. Genetic Correction of Huntington's Disease Phenotypes in Induced Pluripotent Stem Cells. // *Cell Stem Cell*. - 2012. - V. 11(2). - P. 253-263.
6. Andrew S. E., Goldberg Y. P., Theilmann J., Zeisler, J., Hayden, M. R. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. // *Hum Mol Genet*. - 1994. - V. 3(1). - P. 65–67.
7. Arber C., Precious S. V, Cambray S., Risner-Janiczek J. R., Kelly C., Noakes Z., Li M. Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. // *Development*. - 2015. - V. 142(7). - P. 1375–1386.
8. Armstrong M. J., Miyasaki J. M., American Academy of Neurology. Evidence-based guideline: pharmacologic treatment of chorea in Huntington disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. // *Neurology*. - 2012. - V. 79(6). - P. 597–603.
9. Arrasate M., Finkbeiner, S. Protein aggregates in Huntington's disease. // *Exp Neurol*. - 2012. - V. 238(1). - P. 1–11.

10. Atwal R. S., Xia J., Pinchev D., Taylor J., Eppard R. M., Truant R. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. // *Hum Mol Genet.* - 2007. - V. 16(21). - P. 2600–2615.
11. Aubry L., Bugi A., Lefort N., Rousseau F., Peschanski M., Perrier A. L. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - V. 105(43). - P. 16707–16712.
12. Aziz N. A., van Belzen M. J., Coops I. D., Belfroid R. D. M., Roos R. A. C. Parent-of-origin differences of mutant HTT CAG repeat instability in Huntington's disease. // *Eur J Med Genet.* - 2011. - V. 54(4). - P. e413–e418.
13. Bagchi S. P. Differential interactions of phencyclidine with tetrabenazine and reserpine affecting intraneuronal dopamine. // *Biochem Pharmacol.* - 1983. - V. 32(19). - P. 2851–2856.
14. Barr A. N., Fischer J. H., Koller W. C., Spunt A. L., Singhal A. Serum haloperidol concentration and choreiform movements in Huntington's disease. // *Neurology.* - 1988. - V. 38(1). - P. 84–88.
15. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. // *Science.* - 2007. - V. 315(5819). - P. 1709–1712.
16. Bastepe M., Xin W. Huntington Disease: Molecular Diagnostics Approach. // *Curr Protoc Hum Genet.* - 2015. - V. 87. - P. 9.26.1-9.26.23).
17. Bates G. P. History of genetic disease: The molecular genetics of Huntington disease — a history. // *Nat Rev Genet.* - 2005. - V. 6(10). - P. 766–773.
18. Baxa M., Hruska-Plochan M., Juhas S., Vodicka P., Pavlok A., Juhasova J., Motlik J. A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease. // *J Huntingtons Dis.* - 2013. - V. 2(1). - P. 47–68.
19. Baydyuk M., Xu B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. // *Front Cell Neurosci.* - 2014. - V. 8. - P. 254.
20. Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B., Henshaw R., Rosen B., Hyman B. T. Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. // *J Neurochem.* - 1993. - V. 61(3). - P. 1147–1150.
21. Beal M. F., Ferrante R. J., Swartz K. J., Kowall N. W. Chronic quinolinic acid

- lesions in rats closely resemble Huntington's disease. // *J Neurosci.* - 1991. - V. 11(6). - P. 1649–1659.
22. Beal M. F., Kowall N. W., Ellison D. W., Mazurek M. F., Swartz K. J., Martin J. B. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. // *Nature.* - 1986. - V. 321(6066). - P. 168–171.
23. Benitez J., Robledo M., Ramos C., Ayuso C., Astarloa R., Garcia J., Brambati B. Somatic stability in chorionic villi samples and other Huntington fetal tissues. // *Hum Genet.* - 1995. - V. 96(2). - P. 229–232.
24. Benn C. L., Landles C., Li H., Strand A. D., Woodman B., Sathasivam K., Bates G. P. Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. // *Hum Mol Genet.* - 2005. - V. 14(20). - P. 3065–3078.
25. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z. D., Meissner A. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. // *Cell.* - 2011. - V. 144(3). - P. 439–452.
26. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. // *Microbiology.* - 2005. - V. 151. - P. 2551–2561.
27. Brouillet E., Jenkins B. G., Hyman B. T., Ferrante R. J., Kowall N. W., Srivastava R., Beal M. F. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. // *J Neurochem.* - 1993. - V. 60(1). - P. 356–359.
28. Cambray S., Arber C., Little G., Dougalis A. G., de Paola V., Ungless M. A., Rodríguez T. A. Activin induces cortical interneuron identity and differentiation in embryonic stem cell-derived telencephalic neural precursors. // *Nat Commun.* - 2012. - V. 3(1). - P. 841.
29. Camnasio S., Carri A. D., Lombardo A., Grad I., Mariotti C., Castucci A., Cattaneo E. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. // *Neurobiol Dis.* - 2012. - V. 46(1). - P. 41–51.
30. Cankurtaran E. S., Ozalp E., Soygur H., Cakir A. Clinical experience with risperidone and memantine in the treatment of Huntington's disease. // *J Natl Med*

- Assoc. - 2006. - V. 98(8). - P. 1353–1355.
31. Caviston J. P., Ross J. L., Antony S. M., Tokito M., Holzbaur E. L. F. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. // *Proc Natl Acad Sci.* - 2007. - V. 104(24). - P. 10045–10050.
 32. Chae J.-I., Kim D.-W., Lee N., Jeon Y.-J., Jeon I., Kwon J., Wittinghofer A. Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. // *Biochem J.* - 2012. - V. 446(3). - P. 359–371.
 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. // *Nature.* - 2009. - V. 27(3). - P. 275–280.
 34. Chang T.-C., Chen Y.-C., Yang M.-H., Chen C.-H., Hsing E.-W., Ko B.-S., Wu K. K. Rho Kinases Regulate the Renewal and Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells in a Cell Plating Density–Dependent Manner. // *PLoS ONE*, - 2010. - V. 5(2). - P. e9187.
 35. Chen N., Luo T., Wellington C., Metzler M., McCutcheon K., Hayden M. R., Raymond L. A. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. // *J Neurochem.* - 1999. - V. 72(5). - P. 1890–1898.
 36. Chen X., Rinsma M., Janssen J. M., Liu J., Maggio I., Gonçalves M. A. F. V. Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools. // *Nucleic Acids Res.* - 2016. - V. 44(13). - P. 6482–6492.
 37. Cheng P.-H., Li C.-L., Chang Y.-F., Tsai S.-J., Lai Y.-Y., Chan A. W. S., Yang S.-H. miR-196a Ameliorates Phenotypes of Huntington Disease in Cell, Transgenic Mouse, and Induced Pluripotent Stem Cell Models. // *Am J Hum Genet.* - 2013. - V. 93. - P. 306-312
 38. Chiu F.-L., Lin J.-T., Chuang C.-Y., Chien T., Chen C.-M., Che, K.-H., Kuo H.-C. Elucidating the role of the A_{2A} adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs. // *Hum Mol Genet.* - 2015. - V. 24(21). - P. 6066–6079.
 39. Choo Y. S., Johnson G. V. W., MacDonald M., Detloff P. J., Lesort M. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. // *Hum Mol Genet.* - 2004. - V.

- 13(14). - P. 1407–1420.
40. Choudhury S. R., Cui Y., Lubecka K., Stefanska B., Irudayaraj J. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. // *Oncotarget*. - 2016. - V. 7(29). - P. 46545-46556.
41. Colin E., Zala D., Liot G., Rangone H., Borrell-Pagès M., Li X.-J., Humbert S. Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. // *EMBO J*. - 2008. - V. 27(15). - P. 2124–2134.
42. Costa V., Scorrano L. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. // *EMBO J*. - 2012. - V. 31(8). - P. 1853–1864.
43. Davies S. W., Turmaine M., Cozens B. A., DiFiglia M., Sharp A. H., Ross C. A., Bates G. P. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. // *Cell*. - 1997. - V. 90(3). - P. 537–548.
44. Delli Carri A., Onorati M., Castiglioni V., Faedo A., Camnasio S., Toselli M., Cattaneo E. Human Pluripotent Stem Cell Differentiation into Authentic Striatal Projection Neurons. // *Stem Cell Rev Reports*. - 2013. - V. 9(4). - P. 461–474.
45. Delli Carri A., Onorati M., Lelos M. J., Castiglioni V., Faedo A., Menon R., Cattaneo E. Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. // *Development*. - 2013. - V. 140(2). - P. 301–312.
46. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. // *Nature*. - 2011. - V. 471(7340). - P. 602–607.
47. Doig N. M., Moss J., Bolam J. P. Cortical and Thalamic Innervation of Direct and Indirect Pathway Medium-Sized Spiny Neurons in Mouse Striatum. // *J Neurosci*. - 2010. - V. 30(44). - P. 14610–14618.
48. Dunah A. W., Jeong H., Griffin A., Kim Y.-M., Standaert D. G., Hersch S. M., Krainc D. Sp1 and TAFII130 Transcriptional Activity Disrupted in Early Huntington's Disease. // *Science*. - 2002. - V. 296(5576). - P. 2238–2243.
49. El-Akabawy G., Medina L. M., Jeffries A., Price J., Modo M. Purmorphamine Increases DARPP-32 Differentiation in Human Striatal Neural Stem Cells Through the Hedgehog Pathway. // *Stem Cells Dev*. - 2011. - V. 20(11). - P. 1873–1887.

50. El-Daher M.-T., Hangen E., Bruyere J., Poizat G., Al-Ramahi I., Pardo R., Saudou F. Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. // *EMBO J.* - 2015. - V. 34(17). - P. 2255–2271.
51. Elias S., Thion M. S., Yu H., Sousa C. M., Lasgi C., Morin X., Humbert S. Huntingtin Regulates Mammary Stem Cell Division and Differentiation. // *Stem Cell Rep.* - 2014. - V. 2(4). - P. 491–506.
52. Engelender S., Sharp A. H., Colomer V., Tokito M. K., Lanahan A., Worley P., Ross C. A. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. // *Hum Mol Genet.* - 1997. - V. 6(13). - P. 2205–2212.
53. Ericson J., Muhr J., Placzek M., Lints T., Jessell T. M., Edlund T. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. // *Cell.* - 1995. - V. 81(5). - P. 747–756.
54. Estrada-Sánchez A. M., Rebec G. V. Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: Interactions between neurons and astrocytes. // *Basal Ganglia.* - 2012. - V. 2(2). - P. 57–66.
55. Faber P. W., Alter J. R., MacDonald M. E., Hart A. C. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1999. - V. 96(1). - P. 179–184.
56. Ferrante R. J., Kowall N. W., Richardson E. P. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. // *J Neurosci.* - 1991. - V. 11(12). - P. 3877–3887.
57. Frank S. Treatment of Huntington's disease. // *Neurotherapeutics.* - 2014. - V. 11(1). - P. 153–160.
58. Frank S., Testa C. M., Stamler D., Kayson E., Davis C., Edmondson M. C., Christopher E. Effect of Deutetrabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease. // *JAMA.* - 2016. - V. 316(1). - P. 40.
59. Fu Y., Foden J. A., Khayter C., Maeder M. L., Reyon D., Joung J. K., Sander J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. // *Nat Biotechnol.* - 2013. - V. 31(9). - P. 822–826.
60. 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. - V. 85(8). - P. 348–362.
61. Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Pagès M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelières F. P., Saudou F. Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. // *Cell.* - 2004. - V. 118(1). - P. 127–138.
62. Gilbert L. A., Larson M. H., Morsut L., Liu Z., Brar G. A., Torres S. E., Qi L. S. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. // *Cell.* - 2013. - V. 154(2). - P. 442–451.
63. Godin J. D., Colombo K., Molina-Calavita M., Keryer G., Zala D., Charrin B. C., Humbert S. Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. // *Neuron.* - 2010. - V. 67(3). - P. 392–406.
64. Graham R. K., Deng Y., Slow E. J., Haigh B., Bissada N., Lu G., Hayden M. R. Cleavage at the Caspase-6 Site Is Required for Neuronal Dysfunction and Degeneration Due to Mutant Huntingtin. // *Cell.* - 2006. - V. 125(6). - P. 1179–1191.
65. Gray M., Shirasaki D. I., Cepeda C., Andre V. M., Wilburn B., Lu X.-H., Yang X. W. Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. // *J Neurosci.* - 2008. - V. 28(24). - P. 6182–6195.
66. Grigor'eva E., Malankhanova T., Surumbayeva A., Minina J., Kizilova E., Lebedev I., Zakian S. Generation and characterization of iPSCs from human embryonic dermal fibroblasts of a healthy donor from Siberian population. // *BioRxiv.* - 2018. - P. 455535.
67. Grigor'eva E. V., Malankhanova T. B., Surumbayeva A., Minina J. M., Morozov V. V., Abramychева N. Y., Zakian, S. M. Generation of induced pluripotent stem cell line, ICGi007-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with Huntington's disease. // *Stem Cell Res.* - 2019. - V. 34. - P. 101382.
68. Gu M., Gash M. T., Mann V. M., Javoy-Agid F., Cooper J. M., Schapira A. H. V. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. // *Ann Neurol.* - 1996. - V. 39(3). - P. 385–389.
69. Guilinger J. P., Thompson D. B., Liu D. R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to

- FokI nuclease improves the specificity of genome modification. // *Nat Biotechnol.* - 2014. - V. 32(6). - P. 577–582.
70. Gutekunst C. A., Levey A. I., Heilman C. J., Whaley W. L., Yi H., Nash N. R., Hersch S. M. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1995. - V. 92(19). - P. 8710–8714.
71. Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F., Nelson K. E. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. // *PLoS Comput Biol.* - 2005. - V. 1(6). - P. e60.
72. Hale C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns M. P. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. // *Cell.* - 2009. - V. 139(5). - P. 945–956.
73. Haramoto M., Tatemoto H., Muto N. Essential Role of Ascorbic Acid in Neural Differentiation and Development: High Levels of Ascorbic Acid 2-Glucoside Effectively Enhance Nerve Growth Factor-Induced Neurite Formation and Elongation in PC12 Cells. // *J Heal Sci.* - 2008. - V. 54(1). - P. 43–49.
74. Haremake T., Deglincerti A., Brivanlou A. H. Huntingtin is required for ciliogenesis and neurogenesis during early *Xenopus* development. // *Dev Biol.* - 2015. - V. 408(2). - P. 305–315.
75. He X., Tan C., Wang F., Wang Y., Zhou R., Cui D., Feng B. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. // *Nucleic Acids Res.* - 2016. - V. 44(9). - P. e85.
76. Hilton I. B., D'Ippolito A. M., Vockley C. M., Thakore P. I., Crawford G. E., Reddy T. E., Gersbach C. A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. // *Nat Biotechnol.* - 2015. - V. 33(5). - P. 510–517.
77. Hollmann M., Heinemann S. Cloned Glutamate Receptors. // *Annu Rev Neurosci.* - 1994. - V. 17(1). - P. 31–108.
78. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. // *J Bacteriol.* - 1987. - V. 169(12). - P. 5429–5433.

79. Jacobsen J. C., Bawden C. S., Rudiger S. R., McLaughlan C. J., Reid S. J., Waldvogel H. J., Snell R. G. An ovine transgenic Huntington's disease model. // *Hum Mol Genet.* - 2010. - V. 19(10). - P. 1873–1882.
80. Jama M., Millson A., Miller C. E., Lyon E. Triplet Repeat Primed PCR Simplifies Testing for Huntington Disease. // *J Mol Diagn.* - 2013. - V. 15(2). - P. 255-262.
81. Jansen R., Van Embden J. D. A., Gaastra W., Schouls L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. // *Mol Microbiol.* - 2002. - V. 43(6). - P. 1565–1575.
82. Jeon I., Lee N., Li J.-Y., Park I.-H., Park K. S., Moon J., Song J. Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells.* - 2012. - V. 30(9). - P. 2054–2062.
83. Jiang W., Bikard, D., Cox D., Zhang F., Marraffini L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. // *Nat Biotechnol.* - 2013. - V. 31(3). - P. 233–239.
84. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // *Science.* - 2012. - V. 337(6096). - P. 816–821.
85. Juopperi T. A., Kim W., Chiang C.-H., Yu H., Margolis R. L., Ross C. A., Clair D. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. // *Mol Brain.* - 2012. - V. 5(1). - P. 17.
86. Kawaguchi Y., Wilson C. J., Augood S. J., Emson P. C. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. // *Trends in Neurosci.* - 1995. - V. 18(12). - P. 527–535.
87. Kearns N. A., Genga R. M. J., Enuameh M. S., Garber M., Wolfe S. A., Maehr R. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. // *Development.* - 2014. - V. 141(1). - P. 219–223.
88. Kennedy L., Evans E., Chen C.-M., Craven L., Detloff P. J., Ennis M., Shelbourne P. F. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. // *Hum Mol Genet.* - 2003. - V. 12(24). - P. 3359–3367.
89. Khan S., Ahmad K., Alshammari E. M. A., Adnan M., Baig M. H., Lohani M.,

- Haque S. Implication of Caspase-3 as a Common Therapeutic Target for Multineurodegenerative Disorders and Its Inhibition Using Nonpeptidyl Natural Compounds. // *Biomed Res Int.* - 2015. - V. 2015. - P. 379817.
90. Kim M. W., Chelliah Y., Kim S. W., Otwinowski Z., Bezprozvanny I. Secondary Structure of Huntingtin Amino-Terminal Region. // *Structure.* - 2009. - V. 17(9). - P. 1205–1212.
91. Konermann S., Brigham M. D., Trevino A. E., Joung J., Abudayyeh O. O., Barcena C., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. // *Nature.* - 2014. - V. 517(7536). - P. 583–588.
92. Kovalenko M., Dragileva E., St. Claire J., Gillis T., Guide J. R., New J., Wheeler V. C. Msh2 Acts in Medium-Spiny Striatal Neurons as an Enhancer of CAG Instability and Mutant Huntingtin Phenotypes in Huntington's Disease Knock-In Mice. // *PLoS ONE.* - 2012. - V. 7(9). - P. e44273.
93. Kravitz A. V, Tomasi D., LeBlanc K. H., Baler R., Volkow N. D., Bonci A., Ferré S. Cortico-striatal circuits: Novel therapeutic targets for substance use disorders. // *Brain Res.* - 2015. - V. 1628. - P. 186–198.
94. Kremer B., Almqvist E., Theilmann J., Spence N., Telenius H., Goldberg Y. P., Hayden M. R. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. // *Am J Hum Genet.* - 1995. - V. 57(2). - P. 343–350.
95. Lee J.-M., Ramos E. M., Lee J.-H., Gillis T., Mysore J. S., Hayden M. R., COHORT study of the HSG. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. // *Neurology.* - 2012. - V. 78(10). - P. 690–695.
96. Lee W.-C. M., Yoshihara M., Littleton J. T. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. // *Proc Natl Acad Sci.* - 2004. - V. 101(9). - P. 3224–3229.
97. Lerner R. P., Trejo Martinez L. del C. G., Zhu C., Chesselet M.-F., Hickey M. A. Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. // *Brain Res Bull.* - 2012. - V. 87(6). - P. 571–578.
98. Li H., Li S. H., Yu Z. X., Shelbourne P., Li X. J. Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. //

- J Neurosci. - 2001. - P. 21(21). - P. 8473–8481.
99. Li L., Murphy T. H., Hayden M. R., Raymond L. A. Enhanced Striatal NR2B-Containing N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Synaptic Currents in a Mouse Model of Huntington Disease. // J Neurophysiol. - 2004. - V. 92(5). - P. 2738–2746.
100. Li S.-H., Li X.-J. Huntington and its Role in Neuronal Degeneration. // Neurosci. - 2004. - V. 10(5). - P. 467–475.
101. Li X.-J. The early cellular pathology of Huntington's disease. // Mol Neurobiol. - 1999. - V. 20(2–3). - P. 111–124.
102. Lin B., Rommens J. M., Graham R. K., Kalchman M., MacDonald H., Nasir J., Hayden M. R. Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. // Hum Mol Genet. - 1993. - V. 2(10). - P. 1541–1545.
103. Lin C. H., Tallaksen-Greene S., Chien W. M., Cearley J. A., Jackson W. S., Crouse A. B., Detloff P. J. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. // Hum Mol Genet. - 2001. - V. 10(2). - P. 137–144.
104. Lin S., Staahl B. T., Alla R. K., Doudna J. A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. // ELife. - 2014. - V. 3. - P. e04766.
105. Lunn J. S., Sakowski S. A., Hur J., Feldman E. L. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. // Ann Neurol. - 2011. - V. 70(3). - P. 353–361.
106. Luthi-Carter R., Strand A. D., Hanson S. A., Kooperberg C., Schilling G., La Spada A. R., Olson J. M. Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. // Hum Mol Genet. - 2002. - V. 11(17). - P. 1927–1937.
107. Luthi-Carter R., Strand A., Peters N. L., Solano S. M., Hollingsworth Z. R., Menon A. S., Olson J. M. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. // Hum Mol Genet. - 2000. - V. 9(9). - P. 1259–1271.
108. Ma L., Hu B., Liu Y., Vermilyea S. C., Liu H., Gao L., Zhang S.-C. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. // Cell Stem Cell. - 2012. - V. 10(4). - P. 455–464.

109. Ma N., Liao B., Zhang H., Wang L., Shan Y., Xue Y., Pan G. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated Gene correction in integration-free β -Thalassemia induced pluripotent stem cells. // *J Biol Chem.* - 2003. - V. 288(48). - P. 34671–34679.
110. Maglione V., Cannella M., Gradini R., Cislighi G., Squitieri F. Huntingtin fragmentation and increased caspase 3, 8 and 9 activities in lymphoblasts with heterozygous and homozygous Huntington's disease mutation. // *Mech Ageing Dev.* - 2006. - V. 127(2). - P. 213–216.
111. Maira M., Long J. E., Lee A. Y., Rubenstein J. L. R., Stifani S. Role for TGF- β superfamily signaling in telencephalic GABAergic neuron development. // *J Neurodev Disord.* - 2010. - V. 2(1). - P. 48–60.
112. Maiuri T., Woloshansky T., Xia J., Truant R. The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and cilial export signal. // *Hum Mol Genet.* - 2013. - V. 22(7). - P. 1383–1394.
113. Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Bates G. P. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. // *Cell.* - 1996. - V. 87(3). - P. 493–506.
114. Marchetto M. C. N., Carromeu C., Acab A., Yu D., Yeo G. W., Mu Y., Muotri A. R. A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. // *Cell.* - 2010. - V. 143(4). - P. 527–539.
115. Marcora E., Gowan K., Lee J. E. Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2003. - V. 100(16). - P. 9578–9583.
116. Marques Sousa C., Humbert S. Huntingtin: here, there, everywhere! // *J Huntingtons Dis.* - 2013. - V. 2(4). - P. 395–403.
117. Martin D. D. O., Heit R. J., Yap M. C., Davidson M. W., Hayden M. R., Berthiaume L. G. Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of Huntingtin. // *Hum Mol Genet.* - 2014. - V. 23(12). - P. 3166–3179.
118. Martins-Taylor K., Xu R.-H. Concise Review: Genomic Stability of Human

- Induced Pluripotent Stem Cells. // *Stem Cells*. - 2012. - V. 30(1). - P. 22–27.
119. Mattis V. B., Tom C., Akimov S., Saeedian J., Ostergaard M. E., Southwell A. L., Svendsen C. N. HD iPSC-derived neural progenitors accumulate in culture and are susceptible to BDNF withdrawal due to glutamate toxicity. // *Hum Mol Genet*. - 2015. - V. 24(11). - P. 3257–3271.
120. McDonald J. I., Celik H., Rois L. E., Fishberger G., Fowler T., Rees R., Challen G. A. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. // *Biol Open*. - 2016. - V. 5(6). - P. 866-74.
121. McGeer E. G., McGeer P. L. Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. // *Nature*. - 1976. - V. 263(5577). - P. 517–519.
122. Mellott A. J., Forrest M. L., Detamore M. S. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. // *Ann Biomed Eng*. - 2013. - V. 41(3). - P. 446–468.
123. Menalled L. B., Sison J. D., Dragatsis I., Zeitlin S., Chesselet M.-F. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. // *J Comp Neurol*. - 2003. - V. 465(1). - P. 11–26.
124. Miller B. R., Dorner J. L., Bunner K. D., Gaither T. W., Klein E. L., Barton S. J., Rebec G. V. Up-regulation of GLT1 reverses the deficit in cortically evoked striatal ascorbate efflux in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. // *J Neurochem*. - 2012. - V. 121(4). - P. 629–638.
125. Miller J., Arrasate M., Shaby B. A., Mitra S., Masliah E., Finkbeiner S. Quantitative Relationships between Huntingtin Levels, Polyglutamine Length, Inclusion Body Formation, and Neuronal Death Provide Novel Insight into Huntington's Disease Molecular Pathogenesis. // *J Neurosci*. - 2010. - V. 30(31). - P. 10541–10550.
126. Miller J. P., Holcomb J., Al-Ramahi I., de Haro M., Gafni J., Zhang N., Ellerby L. M. Matrix Metalloproteinases Are Modifiers of Huntingtin Proteolysis and Toxicity in Huntington's Disease. // *Neuron*. - 2010. - V. 67(2). - P. 199–212.
127. Mojica F. J. M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system.

- // Microbiology. - 2009. - V. 155(Pt 3). - P. 733–740.
128. Mojica F. J. M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. // *J Mol Evol.* - 2005. - V. 60(2). - P. 174–182.
129. Mojica F. J. M., Díez-Villasenor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. // *Mol Microbiol.* - 2000. - V. 36(1). - P. 244–246.
130. Molero A.E., Gokhan S., Gonzalez S., Feig J.L., Alexandre L.C., Mehler M.F. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington’s disease. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - V. 106(51). - P. 21900-21905.
131. Molina-Calavita M., Barnat M., Elias S., Aparicio E., Piel M., Humbert S. Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. // *J Neurosci.* - 2014. - V. 34(30). - P.10034-10040.
132. Monckton D. G., Wong L. J., Ashizawa T., Caskey C. T. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. // *Hum Mol Genet.* - 1995. - V. 4(1). - P. 1–8.
133. Morigaki R., Goto S. Striatal Vulnerability in Huntington’s Disease: Neuroprotection Versus Neurotoxicity. // *Brain Sci.* - 2017. - V. 7(6). - P. e63.
134. Morizane A., Doi D., Kikuchi T., Nishimura K., Takahashi J. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. // *J Neurosci Res.* - 2011. - V. 89(2). P. 117–126.
135. Muñoz-Sanjuán I., Brivanlou A. H. Neural induction , the default model and embryonic stem cells. // *Nat Rev Neurosci.* - 2002. - V. 3(4). - P. 271–280.
136. Nekrasov E. D., Vigont V. A., Klyushnikov S. A., Lebedeva O. S., Vassina E. M., Bogomazova A. N., Kiselev S. L. Manifestation of Huntington’s disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. // *Mol Neurodegener.* - 2016. - V. 11. - P. 27.
137. Nemudryi A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P., Zakian S. M. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. // *Acta Naturae.* -

2014. - V. 6(3). - P. 19–40.
138. Nguyen G. D., Molero A. E., Gokhan S., Mehler M. F. Functions of Huntingtin in Germ Layer Specification and Organogenesis. // *Plos One*. - 2013. - V. 8(8). - P. e72698.
139. Nopoulos P.C., Aylward E.H., Ross C.A., Mills J.A., Langbehn D.R., Johnson H.J., Magnotta V.A., Pierson R.K., Beglinger L.J., Nance M.A., Barker R.A., Paulsen J.S.; PREDICT-HD Investigators and Coordinators of the Huntington Study Group. Smaller intracranial volume in prodromal Huntington's disease: evidence for abnormal neurodevelopment. // *Brain*. - 2011. - V. 134(Pt 1). - P.137-142.
140. Ochaba J., Lukacsovich T., Csikos G., Zheng S., Margulis J., Salazar L., Steffan J. S. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. // *Proc Natl Acad Sci*. - 2014. - V. 111(47). - P. 16889–16894.
141. Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. // *Nat Methods*. - 2011. - V. 8(5). - P. 409–412.
142. Paleacu D. Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease. // *Neuropsychiatr Dis Treat*. - 2007. - V. 3(5). - P. 545–551.
143. Palidwor G. A., Shcherbinin S., Huska M. R., Rasko T., Stelzl U., Arumughan A., Andrade-Navarro M. A. Detection of Alpha-Rod Protein Repeats Using a Neural Network and Application to Huntingtin. // *PLoS Comput Biol*. - 2009. - V. 5(3). - P. e1000304.
144. Panov A. V., Gutekunst C.-A., Leavitt B. R., Hayden M. R., Burke J. R., Strittmatter W. J., Greenamyre J. T. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. // *Nat Neurosci*. - 2002. - V. 5(8). - P. 731–736.
145. Panov A. V., Burke J. R., Strittmatter W. J., Greenamyre J. T. In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca²⁺-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease. // *Arch Biochem Biophys*. - 2003. - V. 410(1). - P. 1–6.
146. Park I.-H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Daley G. Q. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. // *Cell*. - 2008. - V. 134(5).

- P. 877–886.
147. Parker J. A., Connolly J. B., Wellington C., Hayden M., Dausset J., Neri C. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. // *Proc Natl Acad Sci*. - 2001. - V. 98(23). - P. 13318–13323.
 148. Paulsen J. S., Long J. D., Johnson H. J., Aylward E. H., Ross C. A., Williams, J. K., Panegyres P. K. Clinical and Biomarker Changes in Premanifest Huntington Disease Show Trial Feasibility: A Decade of the PREDICT-HD Study. // *Front Aging Neurosci*. - 2014. - V. 6. - P. 78.
 149. Pennisi E. The CRISPR craze. // *Science*. - 2013. - V. 341(6148). - P. 833–836.
 150. Perez C., Guyot V., Cabaniols J.-P., Gouble A., Micheaux B., Smith J., Duchateau P. Factors affecting double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. // *Biotechniques*. - 2005. - V. 39(1). - P. 109–115.
 151. Pettibone D. J., Pflueger A. B., Totaro J. A. Tetrabenazine-induced depletion of brain monoamines: mechanism by which desmethylimipramine protects cortical norepinephrine. // *Eur J Pharmacol*. - 1984. - V. 102(3–4). - P. 431–436.
 152. Pidgeon C., Rickards H. The pathophysiology and pharmacological treatment of Huntington disease. // *Behav Neurol*. - 2013. - V. 26(4). - P. 245–253.
 153. Pouladi M. A., Jennifer Morton A., Hayden M. R. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. // *Nat Rev Neurosci*. - 2013. - V. 14(10). - P.708-721.
 154. Pramanik S., Basu P., Gangopadhaya P. K., Sinha K. K., Jha D. K., Sinha S., Bhattacharyya N. P. Analysis of CAG and CCG repeats in Huntingtin gene among HD patients and normal populations of India. // *Eur J Hum Genet*. - 2000. - V. 8(9). - P. 678–682.
 155. Ran F. A., Hsu P. D., Lin C.-Y., Gootenberg J. S., Konermann S., Trevino A. E., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. // *Cell*. - 2013. - V. 154(6). - P. 1380–1389.
 156. Raymond L. A., André V. M., Cepeda C., Gladding C. M., Milnerwood A. J., Levine M. S. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent

- alterations in synaptic and receptor function. // *Neuroscience*. - 2011. - V. 198. - P. 252–273.
157. Reiner A., Deng Y.-P. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. // *CNS Neurosci Ther*. - 2018. - V. 24(4). - P. 250–280.
158. Reis S. A., Thompson M. N., Lee J.-M., Fossale E., Kim H.-H., Liao J. K., Seong I. S. Striatal neurons expressing full-length mutant huntingtin exhibit decreased N-cadherin and altered neuritogenesis. // *Hum Mol Genet*. - 2011. - V. 20(12). - P. 2344–2355.
159. Richter H., Zoepfel J., Schermuly J., Maticzka D., Backofen R., Randau L. Characterization of CRISPR RNA processing in *Clostridium thermocellum* and *Methanococcus maripaludis*. // *Nucleic Acids Res*. - 2012. - V. 40(19). - P. 9887–9896.
160. Rockabrand E., Slepko N., Pantalone A., Nukala V. N., Kazantsev A., Marsh J. L., Thompson L. M. The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. // *Hum Mol Genet*. - 2007. - V. 16(1). - P. 61–77.
161. Ross C. A., Tabrizi S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. // *Lancet Neurol*. - 2011. - V. 10(1). - P. 83–98.
162. Roze E., Cahill E., Martin E., Bonnet C., Vanhoutte P., Betuing S., Caboche J. Huntington's Disease and Striatal Signaling. // *Front Neuroanat*. - 2011. - V. 5. - P. 55.
163. Ruzo A., Ismailoglu I., Popowski M., Haremaki T., Croft G. F., Deglincerti A., Brivanlou A. H. Discovery of Novel Isoforms of Huntingtin Reveals a New Hominid-Specific Exon. // *Plos One*. - 2015. - V. 10(5). - P. e0127687.
164. Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. // *Nucleic Acids Res*. - 2011. - V. 39(21). - P. 9275–9282.
165. Schilling G., Becher M. W., Sharp A. H., Jinnah H. A., Duan K., Kotzuk J. A., Borchelt D. R. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. // *Hum Mol Genet*. - 1999. - V. 8(3). - P. 397–407.

166. Schwarcz R., Foster A. C., French E. D., Whetsell W. O., Köhler C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. // *Life Sci.* - 1984. - V. 35(1). - P. 19–32.
167. Seong I. S., Woda J. M., Song J.-J., Lloret A., Abeyrathne P. D., Woo C. J., MacDonald M. E. Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. // *Hum Mol Genet.* - 2010. - V. 19(4). - P. 573–583.
168. Sequeiros J., Ramos E., Cerqueira J., Costa M., Sousa A., Pinto-Basto J., Alonso I. Large normal and reduced penetrance alleles in Huntington disease: instability in families and frequency at the laboratory, at the clinic and in the population. // *Clin Genet.* - 2010. - V. 78(4). - P. 381–387.
169. Shalem O., Sanjana N. E., Hartenian E., Shi X., Scott D. A., Mikkelsen T. S., Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. // *Science.* - 2014. - V. 343(6166). - P. 84–87.
170. Slow E. J., van Raamsdonk J., Rogers D., Coleman S. H., Graham R. K., Deng Y., Hayden M. R. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. // *Hum Mol Genet.* - 2003. - V. 12(13). - P. 1555–1567.
171. Soldner F., Laganière J., Cheng A. W., Hockemeyer D., Gao Q., Alagappan R., Jaenisch R. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. // *Cell.* - 2011. - V. 146(2). - P. 318–331.
172. Squitieri F., Gellera C., Cannella M., Mariotti C., Cislighi G., Rubinsztein D. C., Donato S. Di. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. // *Brain.* - 2003. - V. 126(Pt 4). - P. 946-955.
173. Squitieri F., Maglione V., Orobello S., Fornai F. Genotype-, aging-dependent abnormal caspase activity in Huntington disease blood cells. // *J Neural Transm.* - 2011. - V. 118(11). - P. 1599–1607.
174. Steffan J. S., Agrawal N., Pallos J., Rockabrand E., Trotman L. C., Slepko N., Marsh J. L. SUMO Modification of Huntingtin and Huntington's Disease Pathology. // *Science.* - 2004. - V. 304(5667). - P. 100–104.
175. Steffan J. S., Bodai L., Pallos J., Poelman M., McCampbell A., Apostol B. L., Thompson L. M. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent

- neurodegeneration in *Drosophila*. // *Nature*. - 2001. - V. 413(6857). - P. 739–743.
176. Steffan J. S., Kazantsev A., Spasic-Boskovic O., Greenwald M., Zhu Y.-Z., Gohler H., Thompson L. M. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. // *Proc Natl Acad Sci*. - 2000. - V. 97(12). - P. 6763–6768.
177. Summers K. M. Relationship between genotype and phenotype in monogenic diseases: relevance to polygenic diseases. // *Hum Mutat*. - 1996. - V. 7(4). - P. 283–293.
178. Surmeier D. J., Ding J., Day M., Wang Z., Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. // *Trends Neurosci*. - 2007. - V. 30(5). - P. 228–235.
179. Swami M., Hendricks A. E., Gillis T., Massood T., Mysore J., Myers R. H., Wheeler V. C. Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. // *Hum Mol Genet*. - 2009. - V. 18(16). - P. 3039–3047.
180. Szlachcic W. J., Switonski P. M., Krzyzosiak W. J., Figlerowicz M., Figiel M. Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. // *Dis Model Mech*. - 2015. - V. 8(9). - P. 1047–1057.
181. Tabrizi S. J., Scahill R. I., Owen G., Durr A., Leavitt B. R., Roos R. A., TRACK-HD Investigators. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. // *Lancet Neurol*. - 2013. - V. 12(7). - P. 637–649.
182. 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. - V. 131(5). - P. 861–872.
183. Takahashi K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell*. - 2006. - V. 126(4). - P. 663–676.
184. Takano H., Gusella J. F. The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-

- kB/Rel/dorsal family transcription factor. // *BMC Neurosci.* - 2002. - V. 3. - P. 15.
185. The HD iPSC Consortium. Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Huntington's Disease Show CAG-Repeat-Expansion-Associated Phenotypes. // *Cell Stem Cell.* - 2012. - V. 11(2). - P. 264–278.
186. Thibaut F., Faucheux B. A., Marquez J., Villares J., Menard J. F., Agid Y., Hirsch E. C. Regional distribution of monoamine vesicular uptake sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease: a postmortem study using tritiated tetrabenazine. // *Brain Res.* - 1995. - V. 692(1–2). - P. 233–243.
187. Thompson L. M., Aiken C. T., Kaltenbach L. S., Agrawal N., Illes K., Khoshnan A., Steffan J. S. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. // *J Cell Biol.* - 2009. - V. 187(7). - P. 1083–1099.
188. 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. - V. 282(5391). - P. 1145–1147.
189. Tidball A. M., Neely M. D., Chamberlin R., Aboud A. A., Kumar K. K., Han B., Bowman A. B. Genomic Instability Associated with p53 Knockdown in the Generation of Huntington's Disease Human Induced Pluripotent Stem Cells. // *Plos One.* - 2016. - V. 11(3). - P. e0150372.
190. Tsai S. Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J. A., Thapar V., Reyon D., Joung J. K. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. // *Nat Biotechnol.* - 2014. - V. 32(6). P. 569–576.
191. Twelvetrees A. E., Yuen E. Y., Arancibia-Carcamo I. L., MacAskill A. F., Rostaing P., Lumb M. J., Kittler J. T. Delivery of GABAARs to Synapses Is Mediated by HAP1-KIF5 and Disrupted by Mutant Huntingtin. // *Neuron.* - 2010. - V. 65(1). - P. 53–65.
192. Veitch N. J., Ennis M., McAbney J. P., Shelbourne P. F., Monckton D. G., Monckton D. G. Inherited CAG·CTG allele length is a major modifier of somatic mutation length variability in Huntington disease. // *DNA Repair.* - 2007. - V. 6(6). - P. 789–796.
193. Victor M. B., Richner M., Hermansteyne T. O., Ransdell J. L., Sobieski C.,

- Deng P.-Y., Yoo A. S. Generation of Human Striatal Neurons by MicroRNA-Dependent Direct Conversion of Fibroblasts. // *Neuron*. - 2014. - V. 84(2). P. 311–323.
194. Victor M. B., Richner M., Olsen H. E., Lee S. W., Monteys A. M., Ma C., Yoo A. S. Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes. // *Nat Neurosci*. - 2018. - V. 21(3). - P. 341–352.
195. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T., Loh Y.-H., Li H., Lau F., Rossi D. J. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 7(5). - P. 618–630.
196. Wheeler V. C., Auerbach W., White J. K., Srinidhi J., Auerbach A., Ryan A., MacDonald M. E. Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. // *Hum Mol Genet*. - 1999. - V. 8(1). - P. 115–122.
197. Wheeler V. C., Gutekunst C.-A., Vrbanac V., Lebel L.-A., Schilling G., Hersch S., MacDonald M. E. Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice. // *Hum Mol Genet*. - 2002. - V. 11(6). - P. 633–640.
198. Wild E. J., Tabrizi S. J. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. // *Lancet Neurol*. - 2017. - V. 16(10). - P. 837–847.
199. Wilson C. J., Kawaguchi Y. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. // *J Neurosci*. - 1996. - V. 16(7). - P. 2397–2410.
200. Xu X., Tao Y., Gao X., Zhang L., Li X., Zou W., Livak K. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. // *Cell Discov*. - 2016. - V. 2. - P. 16009.
201. Xu X., Tay Y., Sim B., Yoon S.-I., Huang Y., Ooi J., Pouladi M. A. Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. // *Stem Cell Rep*. - 2017. - V. 8(3). - P. 619–633.
202. Yager L. M., Garcia A. F., Wunsch A. M., Ferguson S. M. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. // *Neuroscience*. - 2015. - V. 301. - P. 529–

- 541.
203. Yan S., Tu Z., Liu Z., Fan N., Yang H., Yang S., Li X.-J. A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. // *Cell*. - 2018. - V. 173(4). - P. 989–1002.e13.
204. Yang L., Guell M., Byrne S., Yang J. L., De Los Angeles A., Mali P., Church, G. Optimization of scarless human stem cell genome editing. // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41(19). - P. 9049–9061.
205. Yang S.-H., Cheng P.-H., Banta H., Piotrowska-Nitsche K., Yang J.-J., Cheng E. C. H., Chan A. W. S. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. // *Nature*. - 2008. - V. 453(7197). - P. 921–924.
206. Yohrling G. J., Farrell L. A., Hollenberg A. N., Cha J.-H. J. Mutant huntingtin increases nuclear corepressor function and enhances ligand-dependent nuclear hormone receptor activation. // *Mol Cell Neurosci*. - 2003. - V. 23(1). - P. 28–38.
207. 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. - V. 324(5928). - P. 797–801.
208. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Thomson J. A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. // *Science*. - 2007. - V. 318(5858). - P. 1917–1920.
209. Zahir T., Chen Y. F., MacDonald J. F., Leipzig N., Tator C. H., Shoichet M. S. Neural Stem/Progenitor Cells Differentiate In Vitro to Neurons by the Combined Action of Dibutyryl cAMP and Interferon- γ . // *Stem Cells Dev.* - 2009. - V. 18(10). - P. 1423–1432.
210. Zhang N., An M. C., Montoro D., Ellerby L. M. Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. // *PLoS Curr.* - 2010. - V. 2. - P. RRN1193.
211. Zhang Y., Ge X., Yang F., Zhang L., Zheng J., Tan X., Gu F. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. // *Sci Rep*. - 2014. - V. 4. - P. 5405.
212. Zhao M., Cheah F.S.H., Chen M., Lee C.G., Law H.-Y., Chong S.S. Improved high sensitivity screen for Huntington disease using a one-step triplet-

- primed PCR and melting curve assay. // Plos One. - 2017. - V. 12(7). - P. e0180984.
213. Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B. R., Goffredo D., Conti L., Cattaneo E. Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. // Science. - 2001. - V. 293(5529). - P. 493–498.
214. Zuccato C., Tartari M., Crotti A., Goffredo D., Valenza M., Conti L., Cattaneo E. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. // Nat Genet. - 2003. - V. 35(1). - P. 76–83.