

Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Е.Д. Некрасов, О.С. Лебедева, Е.М. Васина, А.Н. Богомазова, И.В. Честков, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова, С.А. Ключников, С.Н. Иллариошкин, И.А. Гривенников

ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН;

ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН;

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН (Москва)

Болезнь Гентингтона (БГ) – одно из наиболее тяжелых наследственных нейродегенеративных заболеваний человека, обусловленное экспансией tandemных CAG-повторов в гене *HTT*. Недавно разработанная технология генетического репрограммирования позволяет из фибробластов кожи и других доступных соматических клеток организма получать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); последние, в свою очередь, могут неограниченно расти в культуре и дифференцироваться в любые типы клеток, в т.ч. нейроны, необходимые для изучения молекулярных механизмов развития БГ и других нейродегенеративных заболеваний. Нами с помощью лентивирусной трансфекции были получены ИПСК из первичных фибробластов, взятых от трех пациентов с БГ женского пола (42–46 копий CAG-повторов в мутантном аллеле). Эффективность получения ИПСК составила около 0,2%. Из клонов ИПСК были получены эмбрионидные тельца, а также показано, что в результате спонтанной дифференцировки ИПСК формировались производные всех трех зародышевых листков. Созданный нами набор клеточных линий является на сегодняшний день уникальной платформой для изучения БГ. Он может быть использован для создания эффективной системы, направленной на раскрытие молекулярных механизмов БГ и поиск новых лекарственных препаратов-нейропротекторов методами высокопроизводительного скрининга.

Ключевые слова: болезнь Гентингтона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, генетическое репрограммирование

Открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в 2006 г. [24] входит в десятку важнейших открытий первого десятилетия XXI века по версии экспертов журнала “Science”. ИПСК получают из соматических клеток, переводя их с помощью набора определенных транскрипционных факторов в плюрипотентное состояние. Впервые человеческие ИПСК были получены в 2007 г. [23]. ИПСК могут быть получены из соматических клеток любого пациента и по своим свойствам аналогичны эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), т.е. способны неограниченно поддерживаться в культуре и дифференцироваться в любые типы клеток человека. Можно надеяться, что после тщательных и интенсивных исследований ИПСК они найдут широкое применение в лечении нейродегенеративных и других неврологических заболеваний человека, а также будут использоваться в качестве эффективных тест-систем *in vitro* для разработки новых лекарств.

Болезнь (хорея) Гентингтона – одно из наиболее известных экстрапиримидных нейродегенеративных заболеваний с аутосомно-доминантным наследованием. Распространенность БГ колеблется от 0,1–0,38 (Япония, страны Африки) до 3–7 (страны Западной и Восточной Европы, США, Канада) на 100 тыс. населения [6], в некоторых популяциях доходя до 15–17 и выше на 100 тыс. (о. Тасмания, Венесуэла). Вот уже более 100 лет БГ привлекает к себе пристальное внимание исследователей во всем мире. Это связано прежде всего с особой тяжестью страдания, характеризующегося развитием и неуклонным прогрессированием хореических гиперкинезов, личностных и когнитивных нарушений вплоть до тяжелой демен-

ции и отсутствием до настоящего времени каких-либо эффективных этиопатогенетических методов лечения. Весьма драматично то, что клиника заболевания развивается обычно на 4–5-м десятилетиях жизни (средний возраст начала – 35–44 лет [6]), причем вследствие практически полной пенетрантности мутантного гена БГ его носитель неизбежно заболевает. Дети больного относятся к группе риска с вероятностью передачи им мутантного гена 50%. БГ неуклонно прогрессирует и неизбежно заканчивается полным распадом личности и обездвиженностью больных, требующих постоянного ухода. Смерть, как правило, наступает вследствие интеркуррентных инфекций, общего истощения, либо аспирации твердой или жидкой пищи. Медиана выживаемости при БГ составляет 15–18 лет (колебания от 5 до >25 лет), средний возраст смерти – 54–55 лет [11].

Клонирование гена *HTT*, мутация в котором приводит к развитию БГ, явилось первым важнейшим шагом в изучении молекулярной биологии БГ [26]. При данном заболевании имеет место аномальное увеличение («экспансия») тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых (CAG) повторов в первом экзоне гена *HTT*. Данный ген состоит из 67 экзонов и имеет длину более 200 т.п.о. (тыс. пар оснований). Нормальные аллели *HTT* содержат 10–35 CAG-повторов (медиана – 18). Аллели с числом CAG-повторов 27–35 называют промежуточными или «мутабельными» [19], т.к. они являются источником экспансии CAG-повторов в последующих поколениях с риском 6–10% [22], однако их носители сами не заболевают. Количество повторов 36–39 называют «зоной неполной пенетрантности», т.к. у носителей подобных аллелей клинически манифестная БГ

развивается в редких случаях (частота не описана), нередко в атипично мягкой форме и весьма преклонном возрасте [9, 25]. У больных типичными клинически манифестными формами БГ число CAG-триплетов составляет 40 и более, в редких случаях оно может превышать 100. Различными группами исследователей были выявлены разнообразные значимые клинико-генетические корреляции при БГ. Показано, что с увеличением числа копий CAG-повторов снижается возраст начала болезни [4, 15, 16], возраст дебюта отдельных клинических симптомов и возраст смерти [5, 21], а также ускоряется темп прогрессирования заболевания [1, 2, 12, 14, 21]. Гентингтин широко экспрессируется в различных органах и тканях. При БГ методом электронной микроскопии в нейронах стриатума выявляются характерные внутриядерные включения, представляющие собой высокомолекулярные амилоидоподобные агрегаты [20]. Присутствие в составе включений мутантного белка гентингина подтверждается с помощью иммуногистохимического исследования [10, 17]. Функция данного белка до сих пор точно неизвестна, и ее изучение представляется, таким образом, одной из актуальных проблем современной нейробиологии.

В настоящей работе мы представляем первые результаты получения ИПСК и нейронов из фибробластов больных БГ.

Пациенты и методы исследования

Получение культуры фибробластов из биоптатов кожи человека

В настоящее исследование были включены 3 пациента женского пола с БГ. Число копий CAG-повторов в мутантном гене – 42. После подписания информированного согласия пациента выполнялась биопсия кожи предплечья. Биоптат хранили в среде для культивирования фибробластов* не более 5 часов. Эксплантат в капле среды помещали на крышку чашки Петри (Corning, США) и острым стерильным скальпелем разрезали на небольшие кусочки (размер порядка 1 мм³). Полученные кусочки помещали каждый в отдельную чашку Петри диаметром 35 мм и прижимали сверху стерильным покровным стеклом (Menzel-Glaser, Германия). На стекло наливали среду для культивирования фибробластов, 5 мл на одну чашку 35 мм. Раз в неделю меняли среду на свежую для культивирования фибробластов (5 мл), стараясь не сдвинуть покровное стекло. Примерно через 3 недели рассеивали получившийся монослой фибробластов.

Культивирование фибробластов

Фибробласты растили в среде для их культивирования. Среду меняли раз в 2–4 дня, на чашку 35 мм с фибробластами наливали 2–4 мл среды. Клетки пассировали с использованием 2,5 мг/мл трипсина (Hyclone, США).

Замораживание клеток

Клетки снимали с чашки таким же образом, как и при пересеве. Затем суспендировали в 0,5 мл FBS (Hyclone, США) и аккуратно переносили в криовиалу, содержащую 0,5 мл охлажденной до 4–12°C среды для заморозки клеток. Сразу после этого криовиалу переносили на 24 часа на

–70°C. На следующий день криовиалы перемещали в жидкий азот для продолжительного хранения. В 1 мл среды замораживали клетки одной 35 мм чашки с 50–80% монослоя.

Культивирование ЭСК и ИПСК человека

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

Получение ИПСК

Фибробласты кожи человека (примерно 40 000 клеток) в среде для культивирования фибробластов с bFGF 2 нг/мл (PeproTech, США) рассеивали на культуральную чашку 35 мм (Corning, США). Через 2 дня после посева клетки инфицировали четырьмя оригинальными лентивирусными векторами LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4, MOI 10, 10, 2,5 и 5 соответственно. Процедуры работы с этими лентивирусными векторами описаны ранее [3]. В среду к клеткам добавляли вальпроовую кислоту (VPA) (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 1 мМ и BIX-01294 (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 2 мкМ в течение первой недели после инфекции. Через 5 дней после инфекции клетки пересевали 1:12 на культуральные чашки в среде для культивирования фибробластов. На следующий после посева день среду меняли на среду для получения ИПСК человека. Затем клетки культивировали в этой среде в течение 10–12 дней, среду меняли раз в 2 дня, на чашку 35 мм наливали 2–4 мл среды. К этому моменту на чашках образовалось множество колоний клеток с различной морфологией. Эти колонии механически отбирали и культивировали отдельно в условиях культивирования ЭСК и ИПСК человека.

Окраска клеточных культур антителами

Клетки на чашке промывали 2 раза PBS (ПанЭко, РФ), фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) 20 мин при комнатной температуре, промывали PBS-0,1%Tween-20 (Sigma-Aldrich, США) 3 раза. Блокировали неспецифическую сорбцию антител инкубацией в течение 30 мин в растворе PBS-0,1%Tween-20, содержащем 5% FBS (Hyclone, США), 2% сыворотки козы (Hyclone, США) и 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре. Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS-0,1%Tween-20, содержащем 5% FBS и 2% сыворотки козы, инкубировали 1 час при комнатной температуре, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS-0,1%Tween-20. Вторичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS-0,1%Tween-20. Инкубировали с DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндолил дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США) 0,1 мкг/мл в PBS 10 мин, отмывали 2 раза в PBS-0,1%Tween-20. Список использованных в работе первичных антител приведен в табл. 1.

* Здесь и далее в тексте: состав сред, применявшихся в процессе проводимых экспериментов, может быть направлен всем заинтересованным читателям по запросу (см. адрес для корреспонденции).

таблица 1: Первичные антитела, использованные в исследовании.

Антиген	Каталожный номер	Производитель	Организм-хозяин	Назначение
OCT4	ab18976	Abcam	кролик	Маркер плюрипотентных клеток
SSEA 4	MC-813-70	DSHB	мышь	Маркер плюрипотентных клеток
Cytokeratin (PAN)	M0821	DAKO	мышь	Маркер эктодермы
CD105	M3527	DAKO	мышь	Маркер мезодермы
AFP	A0008	DAKO	кролик	Маркер энтодермы

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Тотальную РНК из клеточных культур выделяли с помощью набора MiniRNA kit (Qiagen, США) согласно прилагающимся инструкциям. Обработку ДНКазой осуществляли непосредственно на колонках с использованием прилагающихся к набору ДНКазы и буфера. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных шестинуклеотидных праймеров (Amersham Biosciences, США), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США), Ribonuclease Inhibitor (Promega, США), dNTPs (Fermentas, США) согласно прилагающимся инструкциям. На одну реакцию брали 0,5–1 мкг тотальной РНК. Для проведения ПЦР-амплификации продуктов реакции обратной транскрипции брали 0,05–0,1 часть реакционной смеси. ПЦР-амплификацию проводили с помощью ScreenMix (Евроген, РФ) согласно инструкциям производителя. Список использованных в работе праймеров приведен в табл. 2.

таблица 2: Праймеры, использованные в исследовании.

Название гена	Последовательности праймеров
OCT4	5'-CGACCATCTGCCGCTTTGAG-3' 5'-CCCCCTGTCCCCATTCCTA-3'
SOX2	5'-TCCTGATTCCAGTTTGCCTC-3' 5'-GCTTAGCCTCGTCGATGAAC-3'
c-Myс	5'-AGTAATCCAGCGAGAGCA-3' 5'-AGGCTGCTGGTTTTCCACTA-3'
NANOG	5'-CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC-3' 5'-TGGAAAGTCCCAGTCGGGTTCCACC-3'
FOXD3	5'-CAAGCCCAAGAACAGCCTAGTGAA-3' 5'-TGACGAAAGCAGTCTGTTGAGTGAGA-3'
HESX1	5'-ACCTGACGCTCATCAGGGAAAGAT-3' 5'-AAAGCAGTTCTTGGTCTCGGCCT-3'
SALL4	5'-TGTGACTTTACGGGTTCTGAGCCA-3' 5'-TGTACTGGTTCCACACAACAGGGT-3'
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTCA-3' 5'-TTCACACCCATGACCAACAT-3'
HTT	5'-CCTTCGAGTCCCTCAAGTCCCTC-3' 5'-GGCTGAGGAAGCTGAGGAG-3'

Цитогенетическое исследование

Приготовление препаратов метафазных хромосом ЭСК и ИПСК человека осуществлялось в соответствии со стандартными лабораторными процедурами цитогенетического исследования. Высушенные на воздухе препараты метафазных хромосом выдерживали несколько дней при комнатной температуре. Препараты обрабатывали 0,05% трипсином (Nuclone, США) в течение 1–5 мин при комнатной температуре, промывали фосфатным буфером (ПанЭко, РФ). Затем препараты окрашивали в красящем растворе Гимза 5% (ПанЭко, РФ) в течение 1–5 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре.

Формирование и культивирование эмбрионных телц

Колонии плюрипотентных стволовых клеток снимали диспазой 1 мг/мл (Invitrogen, США), диссоциировали на фрагменты 400–600 клеток, в среде для культивирования эмбрионных телц переносили в чашки Петри с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США). Эмбрионные телца культивировали в среде для культивирования эмбрионных телц. Среду меняли раз в 2 дня, на чашку 35 мм с эмбрионными телцами наливали 2–4 мл среды.

Спонтанная дифференцировка ЭСК и ИПСК

Эмбрионные телца в возрасте 10–20 дней культивировали на покрытых желатином (Sigma-Aldrich, США) чашках Петри в среде для культивирования эмбрионных телц. Эмбрионные телца прикреплялись к желатиновой подложке, и начиналась миграция клеток из эмбрионных телц на поверхность чашки. Через 2–3 недели образовывались обширные области дифференцированных клеток.

Результаты

Получение фибробластов кожи и ИПСК от пациентов с БГ

Были установлены первичные культуры фибробластов из биоптатов кожи всех трех отобранных пациентов (рис. 1А). Фибробласты культивировали до 3-го пассажа, при этом на первом, втором и третьем пассажах часть культуры подвергали криоконсервации для создания банка первичных клеточных культур и сохранения клеточного материала.

ИПСК удалось получить из фибробластов кожи всех 3 пациентов, страдающих БГ. Для получения ИПСК использовали фибробласты 1–3-го пассажа. Из 40 000 фибробластов, изначально взятых в эксперимент, получали около 100 клонов индуцированных стволовых клеток.

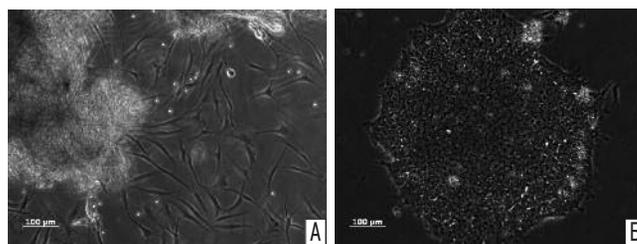


рис. 1: А – фибробласты кожи человека мигрируют из биоптата; Б – колония ИПСК, полученных из фибробластов пациента с БГ.

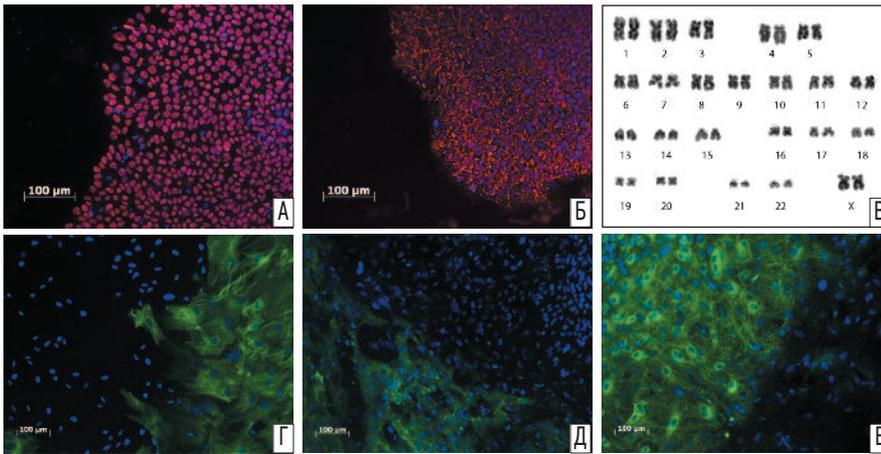


рис. 2: Характеристика ИПСК от пациента, страдающего болезнью Гентингтона.

А – окраска антителами клона ИПСК на маркер плюрипотентных клеток OCT4 (красный), синий цвет – краситель DAPI (ядра клеток); Б – окраска антителами клона ИПСК на маркер плюрипотентных клеток SSEA-4 (красный), синий цвет – DAPI (ядра клеток); В – кариотип одного из клонов ИПСК; Г–Д – окраска антителами клеток, дифференцированных из ИПСК, на маркеры клеток трех зародышевых листков, ядра клеток окрашены DAPI (синий); Г – антитела к эпителиальному маркеру панци-токератину (зеленый), Д – антитела к маркеру мезодермы десмину (зеленый); Е – антитела к маркеру энтодермы α -фетопротину (зеленый).

Несколько десятков клонов отбирали и культивировали отдельно. Только часть полученных клонов показала способность к стабильному росту в среде для культивирования ЭСК и ИПСК человека. По нашим оценкам, эффективность получения ИПСК составила 0,2%. Полученные нами клоны ИПСК морфологически были сходны с ЭСК человека: они имели размер порядка 20 мкм, большое соотношение ядро–цитоплазма, росли монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками (рис. 1Б). Нами был проведен анализ кариотипа клонов ИПСК методом GTG-дифференциального окрашивания: было установлено, что большинство клонов ИПСК имеют нормальный кариотип 46 XX (соответствующий полу исследованных пациентов), они были отобраны для дальнейшей работы (рис. 2В).

Молекулярная характеристика ИПСК

В процессе репрограммирования до плюрипотентного состояния происходят значительные изменения в паттерне экспрессии генов. Анализ экспрессии некоторых маркерных генов в клонах ИПСК проводили двумя различными методами: окрашиванием антителами клеточных культур и ПЦР с обратной транскрипцией. Показано, что наши клоны ИПСК специфично окрашиваются маркерами плюрипотентных клеток OCT4 и SSEA-4 (рис. 2А, 2Б). Методом ПЦР с обратной транскрипцией показана экспрессия маркеров плюрипотентных клеток OCT4, SOX2, с-Мус, NANOG, FOXD3, HESX1, SALL4, на таком же уровне, что и в ЭСК человека. Для нормировки количества кДНК использовали уровень экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*, в качестве положительного и отрицательного контролей использовали кДНК из ЭСК и фибробластов человека.

Функциональная характеристика ИПСК

Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса клонов ИПСК, полученных из фибробластов кожи человека, нами был использован тест на формирование клетками эмбрионидных тел и тест на дифференцировку в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам. Из клонов ИПСК от всех трех пациентов были успешно получены эмбрионидные тельца, которые через 2 недели культивирования в суспензии были переведены на культивирование в адгезионной форме. В результате такой спонтанной дифференцировки образовались клетки различной морфологии. По окончании указанного срока после начала куль-

тивирования в адгезионной форме клетки фиксировали и проводили окрашивание антителами клеточных культур с использованием антител к маркерам трех зародышевых листков. В культуре спонтанно дифференцировавшихся клеток были выявлены клетки, положительно окрашивающиеся на маркер эктодермы панцитокератин, маркер мезодермы CD105 и маркер энтодермы α -фетопротин (рис. 2Г, 2Д, 2Е). Таким образом, полученные ИПСК способны дифференцироваться в клетки – производные трех зародышевых листков.

Обсуждение

БГ вызывается экспансией кодона CAG в гене *HTT*. Этот ген кодирует белок гентингтин (молекулярная масса 350 кДа) с неизвестной функцией. В нормальных аллелях гена у разных людей имеет место различное число копий CAG-повторов, а мутантные аллели у пациентов с БГ характеризуются превышением числа копий повторов более 36. Число повторов, которое приводит к развитию заболевания, не является строго детерминированной величиной, однако установлено, что с увеличением числа копий повторов (CAG) n болезнь проявляется в более тяжелой форме. Белок гентингтин экспрессируется в большинстве типов клеток, в т.ч. и в плюрипотентных клетках. Нами не было отмечено влияния мутации в гене *HTT* на эффективность репрограммирования, что совпадает с результатами других исследователей [9]. В литературе на данный момент описано несколько линий ИПСК с мутацией в гене *HTT* [9, 13, 18], а также линии ЭСК с такой мутацией [7], но все описанные линии различаются по количеству CAG-повторов и полу пациентов. В нашем исследовании мы получили ИПСК от трех пациентов женского пола с 42 копиями CAG-повторов в мутантном аллеле у всех трех больных. Таким образом, наш набор является единственным гомогенным набором клеточных линий по полу и количеству CAG-повторов в мутантном аллеле *HTT*.

На данный момент научным сообществом еще не выработаны строгие правила и инструкции по получению и характеристике ИПСК. Прделанные в работе морфологические, молекулярные и функциональные тесты уже позволяют определять полученные клоны как охарактеризованные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Для более строгого доказательства плюрипотентности можно поставить дополнительные эксперименты, например, проанализировать профили экспрессии генов с помо-

шью полногеномных методов (RNA seq, гибридизация на чипах), а также провести тест на формирование тератом в иммунодефицитных животных.

Для большинства нейродегенеративных заболеваний эффективные методы терапии пока еще не разработаны. Это связано с ограниченностью доступа исследователей к нервным клеткам человека и отсутствием адекватных модельных систем для изучения патогенеза заболеваний и тестирования лекарственных препаратов. Поиск и разработка новых моделей для таких неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Гентингтона, является весьма актуальной задачей. Недавно разработанная технология генетического репрограммирования позволяет из легкодоступных клеток (например, фибробластов кожи) получить в лабораторных условиях ИПСК, которые в свою очередь могут неограниченно расти в культуре и дифференцироваться в любые типы клеток, в т.ч. нейроны,

столь необходимые для изучения молекулярных механизмов развития нейродегенеративной патологии. На сегодняшний день созданный нами набор клеточных линий является уникальной платформой для изучения БГ. Этот набор клеточных линий может быть использован для создания высокоэффективной системы, направленной на анализ молекулярных механизмов заболевания и поиск новых нейропротекторов методами высокопроизводительного скрининга.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН «Центр клеточных и геновых технологий». Исследование было поддержано грантами: Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2103), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-01337).

Список литературы

1. Иллариошкин С.Н. Наследственные моногенные заболевания нервной системы: молекулярный анализ и клинико-генетические сопоставления: Дис. ... докт. мед. наук. М., 1997.
2. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. и др. Анализ экспансии тринуклеотидных повторов как нового механизма мутации при хорее Гентингтона: теоретические и прикладные аспекты. Генетика 1996; 32: 103–109.
3. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Честков И.В. и др. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2011; 4: 82–88.
4. Andrew S.E., Goldberg Y.P., Kremer B. et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. Nat. Genet. 1993; 4: 398–403.
5. Aziz N.A., Jurgens C.K., Landwehrmeyer G.B. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. Neurology 2009; 73: 1280–1285.
6. Bates G., Harper P., Jones L. Huntington's Disease. NY: Oxford University Press, 2002.
7. Bradley C.K., Scott H.A., Chami O. et al. Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. Stem Cells Dev. 2011; 20: 495–502.
8. Britton J.W., Uitti R.J., Ahlskog J.E. et al. Hereditary late-onset chorea without significant dementia: genetic evidence for substantial phenotypic variation in Huntington's disease. Neurology 1995; 45: 443–447.
9. Camnasio S., Carri A.D., Lombardo A. et al. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. Neurobiol. Dis. 2012; 46: 41–51.
10. DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 1997; 277: 1990–1993.
11. Harper B. Huntington disease. J. R. Soc. Med. 2005; 98: 550–560.
12. Illarioshkin S.N., Igarashi S., Onodera O. et al. Trinucleotide repeat length and rate of progression in Huntington's disease. Ann. Neurol. 1994; 36: 630–635.
13. Juopperi T.A., Kim W.R., Chiang C.H. et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. Mol Brain 2012; 5 (1): 17.
14. Kiebertz K., MacDonald M., Shin C. et al. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease. J. Med. Genet. 1994; 14: 872–874.
15. Langbehn D.R., Brinkman R.R., Falush D. et al. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. Clin. Genet. 2004; 65: 267–277.
16. Langbehn D.R., Hayden M.R., Paulsen J.S. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2010; V.153B; P. 397408.
17. Li X.-J., Li S.-H., Sharp A.H. et al. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. Nature 1995; 378: 398–402.
18. Park I.H., Arora N., Huo H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2008; 3: 1180–1186.
19. Potter N.T., Spector E.B., Prior T.W. Technical standards and guidelines for Huntington disease testing. Genet. Med. 2004; 6: 61–65.
20. Roizin L., Stellar S., Liu J.C. Neuronal nuclear-cytoplasmic changes in Huntington's chorea: electron microscope investigations. In: Chase T.N., Wexler N.S., Barbeau A. (eds.) Advances in neurology. NY: Raven Press, 1979: 95–122.
21. Rosenblatt A., Liang K.Y., Zhou H. et al. The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. Neurology 2006; 66: 1016–1020.
22. Semaka A., Collins J.A., Hayden M.R. Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27–35 CAG repeats (intermediate alleles). Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2010; 153B(1): 314–320.
23. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131: 861–872.
24. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663–676.
25. Telenius H., Kremer H.P.H., Theilmann J. et al. Molecular analysis of juvenile Huntington's disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. Hum. Mol. Genet. 1993; 2: 1535–1540.
26. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 1993; 72: 971–983.

A platform for studies of Huntington's disease on the basis of induced pluripotent stem cells

E.D. Nekrasov, O.S. Lebedeva, E.M. Vasina, A.N. Bogomazova, I.V. Chestkov, S.L. Kiselev, M.A. Lagarkova,
S.A. Klyushnikov, S.N. Illarioshkin, I.A. Grivennikov

*N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences;
Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences;
Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow)*

Key words: Huntington's disease, induced pluripotent stem cells, genetic reprogramming

Huntington's disease (HD) is one of the most severe hereditary neurodegenerative disorders caused by CAG repeats expansion in the *HTT* gene. A recently elaborated technology of genetic reprogramming allows obtaining induced pluripotent stem (iPS) cells from fibroblasts and other differentiated somatic cells. These iPS cells can grow in culture and differentiate in any cell types, including neurons, necessary for studies of molecular mechanisms of HD and other neurodegenerative diseases. We obtained, with the use of lentivirus transfection, iPS cells from primary fibroblasts biopsied from three female

patients with HD (42–46 copies of the CAG repeats in the mutant allele). The efficiency of reprogramming was approximately 0.2%. The embryoid bodies were obtained from some clones of iPS cells, and derivatives of all the three embryo layers were shown to be formed as a result of spontaneous iPC cells differentiation. At present, our cell lines represent a unique platform for studies of HD. It may be used for establishing an effective system aimed at discoveries of molecular mechanisms undelaying HD and high-throughput search for novel neuroprotective drugs.

Контактный адрес: Гривенников Игорь Анатольевич – докт. биол. наук, проф., зав. лаб. молекулярной генетики соматических клеток ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН. 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2; e-mail: grivigan@mail.ru;

Некрасов Е.Д. – мл. науч. сотр. лаб. генетических основ клеточных технологий ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН;

Лебедева О.С. – асп. лаб. молекулярной генетики соматических клеток ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН;

Васина Е.М. – ст. науч. сотр. лаб. генетических основ клеточных технологий ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова»;

Богомазова А.Н. – ст. науч. сотр. лаб. генетических основ клеточных технологий ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова»;

Честков И.В. – асп. лаб. генетических основ клеточных технологий ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова»;

Киселев С.Л. – зав. отд. эпигенетики ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН;

Лагарькова М.А. – зав. лаб. генетических основ клеточных технологий отдела эпигенетики ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН;

Клюшников С.А. – вед. науч. сотр. V неврол. отд. ФГБУ «НЦН» РАМН;

Иллариошкин С.Н. – зам. директора по науч. работе, рук. отдела исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН.