Сведения об авторах

Отт Анна Владимировна, Алтайский государственный медицинский университет; адрес: Российская Федерация, 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40; Алтайский краевой кардиологический диспансер; адрес: Российская Федерация, 656055, г. Барнаул, ул. Малахова, д. 46; тел.: +7(923)6527998; e-mail: ott-88@mail.ru

Чумакова Галина Александровна, Алтайский государственный медицинский университет; адрес: Российская Федерация, 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40; Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно - сосудистых заболеваний СО РАМН; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, г. 6; тел.: +7(903)9108040, e-mail: g.a.chumakova@mail.ru

Веселовская Надежда Григорьевна, Алтайский государственный медицинский университет; адрес: Российская Федерация, 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40; Алтайский краевой кардиологический диспансер; адрес: Российская Федерация, 656055, г. Барнаул, ул. Малахова, д. 46; Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно - сосудистых заболеваний СО РАМН; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, г. 6; тел.: +7(913)0207070, e-mail: nadezhda100@rambler.ru

Information about the authors

Ott Anna Vladimirovna, Altay State Medical University; Address: 40, Lenin Avenue, Barnaul, Russian Federation 656038; Altay Regional Cardiological Dispensary; Address: 46, Malakhov Str., Barnaul, Russian Federation 656055; Phone: +7(923)6527998; e-mail: ott-88@mail.ru

Chumakova Galina Aleksandrovna, Altay State Medical University; Address: 40, Lenin avenue, Barnaul, Russian Federation 656038; Multifocal Atherosclerosis, Science Research Institute of complex problems of cardiovascular diseases SD RAMS; Address: 6, Pine Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +7(903)9108040; e-mail: g.a.chumakova@mail.ru

Veselovskaya Nadezhda Grigorievna, Altay State Medical University; Address: 40, Lenin Avenue, Barnaul, Russian Federation 656038; Altay Regional Cardiological Dispensary; Address: 46, Malakhov Str., Barnaul, Russian Federation 656055; Multifocal Atherosclerosis, Science Research Institute of complex problems of cardiovascular diseases SD RAMS; Address: 6, Pine Avenue, Kemerovo, Russian Federation 650002; Phone: +7(913)0207070, e-mail: nadezhda100@rambler.ru

Поступила 2017 г.

Принята к печати 11.08.2017 г.

© ВЕТЧИНОВА А. С., ИЛЛАРИОШКИН С. Н., НОВОСАДОВА Е. В., АБРАМЫЧЕВА Н. Ю., ХАСПЕКОВ Л. Г., ГРИВЕННИКОВ И. А.

УДК 616.8

DOI: 10.20333/2500136-2017-4-53-58

ИСКУССТВЕННАЯ НУКЛЕАЗНАЯ СИСТЕМА CRISPR/CAS9 КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОНОГЕННЫХ ФОРМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А. С. Ветчинова¹, С. Н. Иллариошкин¹, Е. В. Новосадова², Н. Ю. Абрамычева¹,
Л. Г. Хаспекров¹, И. А. Гривенников²

¹Научный центр неврологии, Москва 125367, Российская Федерация

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва 123182, Российская Федерация

Цель исследования. Создание платформы на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), ориентированной на изучение биологической роли мутаций в генах паркинсонизма путем сравнения мутантных и «нормализованных» клеток, получаемых в результате геномного редактирования. Успешное восстановление нормальной нуклеотидной последовательности изучаемого гена на ИПСК имеет целью также получение полноценных дофаминергических нейронов, ориентированных на последующую нейротрансплантацию.

Материал и методы. Для исследования была взята культура ИПСК, полученная в результате генетического репрограммирования фибробластов пациента с аутосомно-доминантной формой БП, ассоциированной с геном LRRK2 (форма PARK8). Коррекция мажорной мутации G2019S гена LRRK2 в культуре ИПСК осуществлялась с использованием искусственной нуклеазной системы CRISPR/Cas9.

Результаты. В работе были осуществлены сборка плазмид, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, липофильная трансфекция ИПСК терапевтическими генетическими конструкциями (плазмиды, одноцепочечные донорные молекулы ДНК), подбор пар РНК-гидов, обеспечивающих восстановление в культуре ИПСК нормального генотипа. В результате редактирования была получена гетерогенная культура, в части клеток которой достигнуто целевое введение корректного нуклеотида G в положение 6055; после этого был выделен клон, несущий нативную нуклеотидную последовательность. Проведено сопоставление особенностей геномного редактирования, осуществляемого с помощью системы CRISPR/Cas9, при работе с клетками в зависимости от числа таргетных мутантных сайтов (гетерозиготность либо компаунд-гетерозиготность).

Заключение. Коррекция мутации, последующая дифференцировка «нормализованных» ИПСК в дофаминергические нейроны и детальное сопоставление морфофункциональных свойств культур нейронов с мутантным и нормальным генотипами позволят уточнить тонкие молекулярные механизмы PARK8-формы паркинсонизма, ассоциированного с мутацией G2019S.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ген LRRK2, клеточное репрограммирование, фибробласты, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дофаминергические нейроны, геномное редактирование, CRISPR/Cas9.

Для цитирования: Ветчинова АС, Иллариошкин СН, Новосадова ЕВ, Абрамычева НЮ, Хаспекров ЛГ, Гривенников ИА. Искусственная нуклеазная система CRISPR/CAS9 как инструмент для изучения моногенных форм болезни Паркинсона. Сибирское медицинское обозрение. 2017;(4): 53-58. DOI: 10.20333/2500136-2017-4-53-58

ARTIFICIAL NUCLEASE SYSTEM CRISP/CAS9 AS AN INSTRUMENT FOR STUDYING MONOGENIC FORMS OF PARKINSON'S DISEASE

A. S. Vetchinova¹, S. N. Illarioshkin¹, E. V. Novosadova², N. Yu. Abramycheva¹, L. G. Khaspekov¹, I. A. Grivennikov²

¹Research Center of Neurology, Moscow 125367, Russian Federation

²Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow 123182, Russian Federation

The aim of the research. The development of a platform based on induced pluripotent stem cells (iPSC), aimed at studying the biological role of mutations in the genes of Parkinson's disease by comparing mutant and "normalized" cells resulting from genomic editing. Successful restoration of the normal nucleotide sequence of the studied gene on the iPSC is also aimed at obtaining full-value dopaminergic neurons oriented to subsequent neurotransplantation.

Material and methods. The iPSC culture obtained as a result of genetic reprogramming of the fibroblasts of a patient with an autosomal dominant form of PD associated with the LRRK2 gene (PARK8 form) was taken for the study. Correction of the major mutation G2019S of the LRRK2 gene in iPSC culture was carried out using the artificial nuclease system CRISPR / Cas9.

Results. Cloning of plasmids expressing the components of the CRISPR / Cas9 system, lipophilic transfection of iPSC with therapeutic genetic constructs (plasmids, single-stranded donor DNA molecules), selection of pairs of RNA-guides ensuring restoration of the normal genotype in iPSC culture were carried out. As a result of genome editing a heterogeneous culture was obtained, the target introduction of the correct nucleotide G at position 6055 was achieved; then a clone bearing the native nucleotide sequence was isolated. Comparison of the features of genomic editing performed with the CRISPR / Cas9 system when working with cells depending on the number of targeted mutant sites (heterozygosity or compound heterozygosity) was made.

Conclusion. Correction of the mutation, subsequent differentiation of "normalized" iPSCs into dopaminergic neurons, and a detailed comparison of the morphofunctional properties of neuronal cultures with mutant and normal genotypes will make it possible to refine the molecular mechanisms of the PARK8 form of Parkinson's disease associated with the G2019S mutation.

Key words: Parkinson's disease, LRRK2 gene, cellular reprogramming, fibroblasts, induced pluripotent stem cells, dopaminergic neurons, genomic editing, CRISPR / Cas9.

Citation: Vetchinova AS, Illarioshkin SN, Novosadova EV, Abramycheva NYu, Khaspekov LG, Grivennikov IA. Artificial nuclease system CRISP/CAS9 as an instrument for studying monogenic forms of Parkinson's disease. *Siberian Medical Review*. 2017;(4): 53-58. DOI: 10.20333/2500136-2017-4-53-58

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний. Оно встречается у 1—2 % людей старше 65 лет, что в связи с увеличением продолжительности жизни в развитых странах мира представляет серьезную социальную проблему.

БП по своей природе имеет многофакторную этиологию [1, 2]. Активное изучение молекулярных основ развития БП позволило идентифицировать множество генов, вовлеченных в ее патогенез, включая редкие наследственные формы заболевания. По существующим данным, наиболее частым молекулярным дефектом, ответственным за развитие наследственной формы БП, являются мутации в гене лейцинбогатой киназы 2 (LRRK2, форма PARK8), кодирующем белок дардадин [3]. Наиболее частая из мутаций в гене LRRK2, нуклеотидная замена G2019S, расположена в киназном домене дардадина и приводит к увеличению его киназной активности, что соответствует доминантному наследованию с предположительным механизмом "gain-of-function" (приобретение мутантным белком новой, цитотоксической функции) [4-6]. Мутация G2019S найдена у больных из разных этнических групп как в семейных, так и в спорадических случаях БП, она обуславливает от 1 % до 14 % всех случаев заболевания в зависимости от семейного анамнеза [7-9]. Описаны и множество других мутаций в гене LRRK2

[10]. Однако несмотря на высокую частоту встречаемости и интенсивные исследования, точные механизмы развития PARK8-формы БП остаются невыясненными, что требует создания адекватных моделей заболевания.

Возможности моделирования нейродегенеративной патологии значительно расширились в последние годы благодаря внедрению в исследовательскую практику методов генетического репрограммирования соматических клеток через стадию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [11, 12].

Получаемые от конкретных пациентов ИПСК способны генерировать все клеточные типы, включая редкие и труднодоступные популяции клеток человека [13]. Модели нейродегенеративных заболеваний на основе ИПСК, помимо их применения для скрининга новых лекарственных препаратов, позволяют преодолевать трудности в изучении механизмов развития данной патологии, которые отчасти связаны с ограниченным доступом к человеческим нервным клеткам.

При перепрограммировании клеток кожи пациентов с БП, обусловленной мутацией G2019S в гене LRRK2, выявлено повреждение ядерных нейрональных мембран, которое является мощным фактором развития нейродегенеративного процесса [14]. Изменение архитектуры ядра ведет к снижению способности клеток дифференцироваться в

функциональные нейроны, включая дофаминергические нейроны. В последние годы показана роль LRRK2 в иммунном ответе и ряде важнейших клеточных функций, включая апоптоз, аутофагию, поддержание цитоскелета [2].

Растущую роль в современной нейробиологии играют новые высокотехнологичные подходы к моделированию нейродегенеративных заболеваний человека. Среди них - направленное геномное редактирование с помощью искусственных нуклеазных систем (CRISPR/Cas9 и др.), позволяющее осуществлять коррекцию генетических дефектов на уровне клеток. Особенно перспективным представляется применение технологии геномного редактирования на специализированных нейронах и ИПСК, получаемых от больных с наследственными формами нейродегенерации в результате клеточного репрограммирования [15].

В нашей работе мы осуществили коррекцию мутации G2019S гена LRRK2 в культуре ИПСК, полученной из фибробластов пациента с аутосомно-доминантной формой БП.

Материал и методы

Сборка плазмид, экспрессирующие компоненты системы CRISPR/Cas9

Важным моментом при работе с системой CRISPR/Cas9 является тщательный подбор сайтов для специфического внесения двухнитевого разрыва. Для большей специфичности нами были использованы следующие биоинформатические ресурсы и программы: www.genome-engineering.org, www.dna20.com/ecommerce/cas9/input и www.e-crisp.org. Подобранные с помощью биоинформатических программ двухцепочечные ДНК-спейсоры клонировали в вектор-основу pgRNA-dCas(D10A)-Neo с помощью рестрикции по сайту Bbs I [16]. Затем клетки *E. coli* трансформировали 10 мкл лигазной смеси согласно стандартному протоколу. Для дальнейшего анализа выросшие колонии по десять для каждого двухцепочечного спейсора проверяли на наличие и размер вставок при помощи ПЦР бактериальных колоний без выделения плазмидной ДНК с использованием праймеров U6 Forw (GAGGGCCTATTCCCATGATTCC) и Scaffold Rev (GCACCGACTCGGTGCCACT), а также пар праймеров, включающих U6 Forw и внутренний праймер для каждого гена, соответственно (табл. 1). Продукты ПЦР-амплификации анализировали электрофорезом в 1,5 %

Таблица 1

РНК-гиды и праймеры

РНК-гид для коррекции мутации	Праймеры Forw (прямые)	Праймеры Rev (обратные)
№ 17: GCTCAGTA CTGCT GTAGAAT	CACCGCTCAG TACTGTGTAGAAT	AAACATTCTACAG CAGTACTGAGC
№ 18: AATGCTG CCATCA TTGCAAA	CACCGAATGCT GCCATCATGCAAA	AACTTTGCAAT GATGGCAGCAAT
№ 23: AATGGGG ATAAAA ACATCAG	CACCGAATGG GGATAAAAACATCAG	AAACCTGATGTT TTTATCCCCATT
№ 21: CAATGTG CTGCTT TTCACAC	CACCGCAAT GTGCTGCTTTTCACAC	AAACGTGGA AAA GCAGCACATTG
№5: AAAACACA GAGGG CACACC	CACCGAAAACA TCAGAGGGCACACC	CACCGAAAACACAG AGGGCACACC

агарозном геле. Из проанализированных таким образом 50 клонов вставку необходимой длины содержали 34 колонии.

В работе для коррекции мутаций гена LRRK2 мы использовали одноцепочечные олигонуклеотиды длиной 120 п.о. (Евроген, Россия, структура олигонуклеотидов доступна по запросу).

Культивирование клеток и трансфекция

Культура ИПСК, несущая мутацию G2019S в гене LRRK2, была получена из фибробластов наблюдавшегося нами в клинике пациента с БП. Культивирование проводили на среде для бесфицерного культивирования эмбриональных стволовых клеток человека mTESRI (Stem Cell Technologies, Канада). В качестве подложки для культивирования использовался Matrigel (BD Biosciences, США). Смена среды производилась каждый день. Клетки пассировали каждые 5-7 дней с использованием 1 мг/мл диспазы (Invitrogen, США). Для доставки в ИПСК генетических конструкций (плазмиды, одноцепочечные донорные молекулы ДНК) использовали метод липофильной трансфекции с Turbofect (Fermentas).

ПЦР целевых участков гена LRRK2 и секвенирование по Сэнгеру

Геномную ДНК выделяли с помощью наборов Wizard genomic DNA purification kit (Promega) и K-Corb-100 (Синтол). Реакции ПЦР проводили на приборе Veriti (Applied Biosystems, США) с применением высокоточных полимераз, ПЦР в режиме реального времени для отбора клонов - на приборе АНК32М (Синтол). Анализ нуклеотидных последовательностей в «областях интереса» в гене LRRK2, а также последовательностей спейсоров РНК-гидов проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США). Структура использованных в работе праймеров и зондов доступна по запросу.

Результаты и обсуждение

Наличие исходной мутации G2019S в гене LRRK2 в клетках крови, фибробластах и ИПСК от пациента с БП было подтверждено прямым секвенированием (рис. 1).

Для коррекции указанной точечной мутации использовали плазмиду pgRNA-dCas(D10A)-Neo, обладающую низкой активностью и содержащей селективный маркер (ген устойчивости к неомицину) и различные варианты ДНК-спейсоров. ИПСК трансфицировали различными вариантами пар плазмиды pgRNA-dCas(D10A)-Neo и одно-

Рисунок 1. Мутация G2019S в гене LRRK2 (стрелка) на линии ИПСК, полученной из фибробластов пациента с PARK8-формой БП.

цепочечных зондов (поочередно) в качестве доноров для коррекции мутации в экзоне.

Через 48 часов после проведенной трансфекции к клеткам добавляли селективный антибиотик G-418 в рабочей концентрации 75 мкг/мл, предварительно отобранной на нетрансфицированной культуре. Селекцию проводили в течение 10 дней, затем выжившие клоны наращивали в чашках Петри. Из части подросших клеток была выделена геномная ДНК с последующей ПЦР-амплификацией участка-мишени и прямое секвенирование. Анализ нуклеотидной последовательности участка гена LRRK2 показал, что введение нуклеотида G в положение 6055 с восстановлением нормального генотипа было достигнуто при использовании пар гидов №№ 18, 17 и №№ 18, 23 при одновременном введении одноцепочечного зонда, выступающего в качестве донорного фрагмента «дикого» типа для гомологичного участка экзона; при этом, однако, в популяции клеток наблюдалась гетерогенность (рис. 2). В то же время, коррекции мутации с применением гидов №№ 5 и 21 оказалась не эффективной. Для отбора клонов с откорректированной мутацией клетки, отредактированные с помощью пар гидов №№ 17, 18 и №№ 18, 23 рассевали на 24-луночный планшет и подращивали в течение недели. Затем выросшие клоны вновь пересевали на второй дублирующий 24-луночный планшет. Ранжированные клетки с первого планшета снимали с помощью трипсина, промывали раствором PBS, после чего выделяли геномную ДНК на колонках набора К-Сорб-100 (Синтол). С помощью высокоточной полиме-

Рисунок 2. Сиквенсы различных отредактированных клонов.

А - здоровый донор (фибробласты); Б - линия ИПСК от пациента с PARK8-формой БП после CRISPR/Cas9-редактирования мутации G2019Sc использованием пары РНК-гидов №№ 18 и 17; В - линия ИПСК от пациента с PARK8-формой БП после CRISPR/Cas9-редактирования мутации G2019Sc использованием пары РНК-гидов №№ 18 и 23. На рисунках 2 Б и 2 В можно видеть гетерогенную популяцию клеток с нормальной и мутантной нуклеотидными последовательностями. Таргетный сайт указан стрелкой.

Рисунок 3. Результат геномного редактирования на отобранном клоне.

А - мутантная нуклеотидная последовательность на ИПСК, полученных от пациента с PARK8-формой БП; Б - нормальная нуклеотидная последовательность на той же линии ИПСК после геномного редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9. Таргетный сайт указан стрелкой

разы Pfu DNA polymerase (Fermentas) и соответствующими парами праймеров и зондов анализировали участки-гена, которые служили мишенями для редактирования генома, в режиме реального времени.

Из проанализированных 21 клон был выявлен один клон, несущий нативную нуклеотидную последовательность. В остальных клонках наблюдалась нуклеотидная гетерогенность. Для подтверждения эффективной коррекции мутации ПЦР-фрагмент этого клон был отсеквенирован по Сэнгеру (рис. 3).

Ранее мы уже проводили редактирование генома ИПСК, полученных из фибробластов носителя компаунд-гетерозиготных мутаций в гене PARK2, с использованием системы CRISPR/Cas9; в этой работе нуклеаза и РНК-гид, кодировались двумя разными плазмидами [17]. Мы столкнулись с проблемой эффективной одновременной доставки в нужных соотношениях молекул нуклеаз, РНК-гидов и доноров нативной последовательности. Поэтому в данной работе мы использовали вектор, который в своем составе уже содержал нуклеазу-никазу и РНК-гид. Редактирование мутации проводилось более прицельно, но, как и в первом опыте, мы столкнулись с гетерогенностью получаемых клонов. Рассмотренные проблемы редактирования ИПСК связаны с тем, что данный тип клеток крайне чувствителен к повреждениям ДНК. Следовательно, необходимо стремиться к повышению эффективности гомологичной рекомбинации, например, путем добавления белков, являющихся ингибиторами негомологичной рекомбинации [18]. Такой подход будет нами тестироваться в следующих экспериментальных сериях.

Заключение

Таким образом, нами проведено успешное редактирование генома ИПСК, полученных из фибробластов пациента - носителя точечной мутации в гене LRRK2. С помощью системы CRISPR/Cas9 удалось восстановить нормальную нуклеотидную последовательность данного гена, ассоциированного с развитием аутосомно-доминантной формы

БП с поздним началом развития симптомов. На следующем этапе предполагается дифференцировка «нормализованных» ИПСК в дофаминергические нейроны, с детальным сопоставлением морфофункциональных свойств культур нейронов, имеющих мутантный и нормальный генотипы. Такие сопоставления позволят уточнить тонкие молекулярные механизмы PARK8-формы паркинсонизма, ассоциированного с мутацией G2019S. Возможность направленной коррекции генотипа и получения дофаминергических нейронов, не несущих мутации, имеет большое значение для успешного развития нейротрансплантации при генетических вариантах БП и других нейродегенеративных заболеваний.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за оказанную помощь руководителю отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики Института молекулярной генетики РАН профессору В. З. Тарантулу и научному сотруднику лаборатории репликации и репарации генома Института молекулярной генетики РАН В. В. Ненашевой. Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-01047-П.

Литература

- Иллариошкин СН. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2015; 4: 4-13. DOI: 10.18821/1560-9545-2015-20-4-4-13
- Пчелина СН, Емельянов АК, Усенко ТС. Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене. *Молекулярная биология*. 2014; 1: 3-14. DOI: 10.1134/s0026893314010117
- Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Disord*. 2007; 17: 343-50. DOI: 10.1002/mds.21676
- Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, John Q, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM. Biochemical and pathological characterization of LRRK2. *Annals Neurology*. 2008; 59: 315-18. DOI: 10.1002/ana.20791
- West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, Biskup S, Zhang Z, Lim K-L, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Molecular Genetics*. 2007; 16: 223-32. DOI: 10.1093/hmg/ddl471
- Giasson BI, van Deerlin VM. Mutations in LRRK2 as a cause of Parkinson's disease. *Neurosignals*. 2008; 16: 99-103. DOI: 10.1159/000109764
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, de Munain AL, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez J, Nicholl D. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004; 44: 595-600. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.10.023
- Zimprich A, Biskup S, Lechtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan MJ, Uitti R, Calne D, Stoessl AJ, Ronald F, Pfeiffer R, Patenge N, Carb I. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004; 44: 601-7. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.005
- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*. 2008; 7: 583-86. DOI: 10.1016/s1474-4422(08)70117-0

10. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nature reviews. Disease primers*. 2017; 3: 17013. DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.

11. Иллариошкин СН, Хаспеков ИА, Гривенников ИА. Моделирование болезни Паркинсона с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. М.: Соверо Пресс, 2016: 250.

12. Medvedev SP, Zakian SM. Models of hereditary neurodegenerative, neurological, and psychiatric diseases based on induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research*. 2016; 3: 3-66. DOI: 10.1177/1744501916030005

13. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*. 2007; 2: 3081-89 DOI: 10.1038/nprot.2007.418.

14. Lui G, Qu J, Suzuki K, Nivet E, Li M, Montserrat N, Yi F, Xu X, Ruiz S, Zhang W, Wagner U, Kim A, Ren B, Li Y, Goebel A, Kim J, Soligalla D, Dubois I. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*. 2012; 491: 603-607. DOI: 10.1038/nature11557

15. Ветчинова АС, Коновалова ЕВ, Иллариошкин СН. Технология редактирования генома и возможности ее применения в клеточной нейробиологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2015; 4: 59-63.

16. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339: 819-25. DOI: 10.1126/science.1231143

17. Ветчинова АС, Коновалова ЕВ, Волчков ПЮ, Абрамичева НЮ, Иллариошкин СН. Редактирование генома на клеточной модели генетической формы болезни Паркинсона. *Гены и клетки*. 2016; 2: 114-18.

18. Yu C, Liu Y, Ma, Lui K, Xu, Zhang Y, Lui H, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 142-47. DOI: 10.1016/j.stem.2015.01.003

References

- Illarioshkin SN. Modern view on the etiology of Parkinson's disease. *Neurological Journal*. 2015; 4: 4-13. (In Russian).
- Pchelina N., Emelyanov A. K., Usenko T. S. Molecular basis of Parkinson's disease linked to LRRK2 mutations. *Molecular Biology*. 2014; 1: 3-14. (In Russian).
- Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Disord*. 2007; 17: 343-50. DOI: 10.1002/mds.21676
- Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, John Q, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM. Biochemical and pathological characterization of LRRK2. *Annals Neurology*. 2008; 59: 315-18 DOI: 10.1002/ana.20791
- West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, Biskup S, Zhang Z, Lim K-L, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Molecular Genetics*. 2007; 16: 223-232. DOI: 10.1093/hmg/ddl471
- Giasson BI, van Deerlin VM. Mutations in LRRK2 as a cause of Parkinson's disease. *Neurosignals*. 2008; 16: 99-103. DOI: 10.1159/000109764

7. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, de Munain AL, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez J, Nicholl D. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004; 44: 595-600. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.10.023

8. Zimprich A, Biskup S, Lechtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan MJ, Uitti R, Calne D, Stoessl AJ, Ronald F, Pfeiffer R, Patenge N, Carb I. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004; 44: 601-7. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.005

9. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*. 2008; 7: 583-86. DOI: 10.1016/S1473-2522(08)70117-0

10. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nature reviews. Disease primers*. 2017; 3: 17013. DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.

11. Illarionovskiy SN, Khaspekov LG, Grivennikov IA. Modeling of Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells. M.: SoveroPress, 2016: 250. (In Russian).

12. Medvedev SP, Zakian SM. Models of hereditary neurodegenerative, neurological, and psychiatric diseases based on induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research*. 2016; 3: 3-66. DOI: 2174/9781681082578117030005

13. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*. 2007; 2: 3081-89 DOI: 10.1038/nprot.2007.418.

14. Lui G, Qu J, Suzuki K, Nivet E, Li M, Montserrat N, Yi F, Xu X, Ruiz S, Zhang W, Wagner U, Kim A, Ren B, Li Y, Goebel A, Kim J, Soligalla D, Dubois I. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*. 2012; 491: 603-607. DOI: 10.1038/nature11557

15. Vetchinova AS, Konovalova EV, Lunev EA, Illarionovskiy SN. A genome editing technology and capabilities of its application in cellular neurobiology. *Annaly nevrologii*. 2015; 4: 59-64 (In Russian).

16. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome

engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339: 819- 25. DOI:10.1126/science.1231143

17. Vetchinova AS, Konovalova EV, Volchkov PYu, Abramychcheva NYu, Illarionovskiy SN. Genome editing on cell model of the genetic form of Parkinson's disease. *Genes&Cells*, 2016; 2: 114-18. (In Russian).

18. Yu C, Liu Y, Ma, Lui K, Xu, Zhang Y, Lui H, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 142-47. DOI: 10.1016/j.stem.2015.01.003

Сведения об авторах

Ветчинова Анна Сергеевна, Научный центр неврологии; адрес: Российская Федерация 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, г. 80; e-mail: annvet@mail.ru

Илларионовский Сергей Николаевич, Научный центр неврологии; адрес: Российская Федерация, 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, г. 80; e-mail: snillario@gmail.com

Новосадова Екатерина Вячеславовна, Институт молекулярной генетики РАН; адрес: Российская Федерация 123182, г. Москва, площадь акад. И.В. Курчатова, г. 2; e-mail: novek-img@mail.ru

Абрамичева Наталья Юрьевна, Научный центр неврологии; адрес: Российская Федерация 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, г. 80; e-mail: nataabr@rambler.ru

Хаспеков Леонид Георгиевич, Научный центр неврологии; адрес: Российская Федерация 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, г. 80; e-mail: khaspekleon@mail.ru

Гривенников Игорь Анатольевич, Институт молекулярной генетики РАН; адрес: Российская Федерация 123182, г. Москва, площадь акад. И.В. Курчатова, г. 2; e-mail: igorag@img.ras.ru

Information about the authors

Vetchinova Anna Sergeevna, Research Center of Neurology; Address: 80, Volokolamskoye Sh., Moscow, Russian Federation 125367; e-mail: annvet@mail.ru

Illarionovskiy Sergey Nikolaevich, Research Center of Neurology; Address: 80, Volokolamskoye Sh., Moscow, Russian Federation 125367; e-mail: snillario@gmail.com

Novosadova Ekaterina Vyacheslavovna, Institute of Molecular Genetics RAS; Address: 2, akad. I.V. Kurchatov sq., Moscow, Russian Federation 123182; e-mail: novek-img@mail.ru

Abramychcheva Natalya Yurievna, Research Center of Neurology; Address: 80, Volokolamskoye Sh., Moscow, Russian Federation 125367; e-mail: nataabr@rambler.ru

Khaspekov Leonid Georgievich, Research Center of Neurology; Address: 80, Volokolamskoye Sh., Moscow, Russian Federation 125367; e-mail: khaspekleon@mail.ru

Grivennikov Igor Anatolyevich, Institute of Molecular Genetics RAS; Address: 2, akad. I.V. Kurchatov. sq., Moscow, Russian Federation 123182; e-mail: igorag@img.ras.ru

Поступила 16.06.2017 г.
Принята к печати 11.08.2017 г.

© ЗАЙЦЕВА Н. И., БЕЛОВА Н. В., ЛАГОДА Д. Ю., ЮСУПОВА Д. Г., КОРЕПИНА О. С., СУПОНЕВА Н. А., ГНЕДОВСКАЯ Е. В., ПИРАДОВ М. А.

УДК 612.816.3

DOI: 10.20333/2500136-2017-4-58-65

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ ВЫЗВАННЫХ КОЖНЫХ СИМПАТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПРИ КАРПАЛЬНОМ ТУННЕЛЬНОМ СИНДРОМЕ

Н. И. Зайцева¹, Н. В. Белова², Д. Ю. Лагода², Д. Г. Юсупова², О. С. Корепина²,
Н. А. Супонева², Е. В. Гнедовская², М. А. Пирадов²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва 119192, Российская Федерация

² Научный центр неврологии, Москва 125367, Российская Федерация