

на правах рукописи



УСТЬЯНЦЕВА ЕЛИЗАВЕТА ИВАНОВНА

**СОЗДАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО
АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА С ПОМОЩЬЮ
ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ**

клеточная биология, цитология, гистология
03.03.04

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2021

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Медведев Сергей Петрович** к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Салмина Алла Борисовна** д.м.н., профессор, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией экспериментальной нейробиологии Отдела исследований мозга федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», г. Москва.

Кулемзин Сергей Викторович к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Исследование клеточных процессов, лежащих в основе нейродегенерации – ключ к пониманию патогенеза заболевания. Одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний – боковой амиотрофический склероз (БАС), характеризуется постепенной гибелью моторных нейронов, которая приводит к параличу скелетной мускулатуры и диафрагмы. Несмотря на большую неоднородность БАС с клинической и этиологической точек зрения, на клеточном уровне, все сводится к ограниченному кругу патологических процессов, которые приводят к гибели нейрона: нарушение гомеостаза белков и метаболизма РНК; дефекты функционирования митохондрий, динамики цитоскелета и аксонального транспорта; окислительный стресс и глутаматная эксайтотоксичность. Окислительный стресс особенно интересен, так как он может быть как причиной возникновения патологии, так и следствием нарушения других процессов. Кроме того, один из генов, связанных с развитием БАС – *SOD1* – кодирует Cu-Zn супероксиддисмутазу 1, белок антиокислительной системы клетки, ответственный за превращение молекул супероксида в перекись водорода, что лишним раз подчеркивает роль окислительного стресса в патогенезе заболевания.

В исследовании БАС особенно остро стоит вопрос объекта. Традиционные подходы с использованием посмертных образцов тканей пациентов, или трансгенных животных не всегда помогают, так как не полностью отражают некоторые аспекты нейродегенерации (Miller et al. 2007). Перспективны в данном случае клеточные модели, которые способны воспроизводить особенности заболеваний и при этом удобны для массового скрининга лекарственных соединений.

Поскольку, при БАС специфически страдают моторные нейроны (МН), для исследования особенностей заболевания необходимо иметь стабильный источник этих клеток. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от больных, могут выступать в качестве такого источника, поскольку несут в себе все генетические особенности пациента. Однако, по этой же причине, сравнение данных, полученных на клетках разных пациентов, затруднено, из-за разного генетического фона, который может вносить свой вклад в развитие патологического процесса. Возможное решение данной проблемы – создание изогенных клеточных линий с помощью методов редактирования генома. Такой подход не только позволяет создавать адекватные пары «случай-контроль», но и исследовать индивидуальный вклад разных мутаций в развитие заболевания, что особенно актуально для БАС с его генетическим разнообразием.

Один из основных вопросов в использовании клеточных моделей состоит в том, каким образом можно фиксировать патологические изменения? Генетически-кодированные биосенсоры представляют собой известный инструмент для изучения биологических процессов. Они позволяют в режиме реального времени регистрировать молекулы-мессенджеры, метаболиты и активность ферментов в живых системах различной сложности: от культивируемых клеток до трансгенных животных (Bagchi et al. 2007; Enns and Cowan 2017). На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически-кодированные биосенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций в живых системах. Одним из способов их применения является исследование таких глобальных процессов, как нейродегенерация.

Целью данной работы является создание и характеристика клеточной модели бокового амиотрофического склероза на основе индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток, несущих встройку генетически-кодированных биосенсоров перекиси водорода.

Задачи:

- 1) Внести однонуклеотидные замены в позиции с.272A>C и с.382G>C гена *SOD1* ИПСК здорового донора K7-4, которые приводят к замене аспарагина на аланин в 90

позиции (D90A) и глицина на аргинин в 127 позиции (G127R) белка SOD1, соответственно;

- 2) Получить ИПСК из моноклеарных клеток периферической крови больного наследственной формой БАС, несущего гомозиготную замену в позиции с.272A>C гена *SOD1*;
- 3) Встроить генетические конструкции, предназначенные для доксициклин-индуцируемой экспрессии белков-биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) и митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1), в локус *AAVS1* ИПСК здорового донора, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами;
- 4) Провести направленную дифференцировку ИПСК здорового донора, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами в моторные нейроны;
- 5) Охарактеризовать реакцию биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) и митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1) в ответ на депривацию питательных веществ, добавление перекиси водорода и индукцию глутаматной эксайтотоксичности.

Научная новизна работы

В данной работе были получены изогенные линии ИПСК, содержащие однонуклеотидные замены с.272A>C и с.382G>C в гене *SOD1* хотя бы в одном аллеле. Одинаковый генетический фон, который разделяют эти линии и исходная здоровая линия ИПСК, позволяет объединить их в единую модельную систему, которая может быть использована для изучения вклада данных мутаций в развитие БАС. Показано, что разные мутации в гене *SOD1* проявляются по-разному на уровне моторных нейронов, полученных из ИПСК, с более выраженным патологическим действием с.382G>C.

Кроме того, на основе здоровых ИПСК, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами впервые был получен ряд трансгенных линий, несущих встройку генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-управляемой экспрессии (Tet-On) биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях. Все элементы данных конструкций: последовательности биосенсоров, компоненты системы Tet-On и другие, встроены при помощи CRISPR/Cas9 в специфический «safe harbor»-локус *AAVS1*. Встройки в *AAVS1* не оказывают негативного влияния на функционирование клетки и, следовательно, не влияют на результаты исследований. Сенсоры, несмотря на наличие только одной копии в геноме, продуцируют удовлетворительный сигнал, который адекватно отражает изменения в уровне перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученная в ходе работы модельная система может использоваться для изучения патологических особенностей БАС и в качестве платформы для скрининга химических веществ – потенциальных лекарственных средств.

Подходы, использованные для внесения замен и создания трансгенных линий ИПСК, могут быть применены для расширения модели за счет добавления новых мутаций или биосенсоров других клеточных процессов.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Моторные нейроны, полученные в результате направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток со встроенными в локус *AAVS1* (Adeno-associated virus integration site 1) флуоресцентными биосенсорами перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1, являются моделью для изучения роли окислительного стресса в патогенезе бокового амиотрофического склероза

- 2) Редактирование гена *SOD1* с помощью системы CRISPR/Cas9 с образованием замен G127R и K128X в последовательности белка SOD1, приводит к повышению уровня перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях моторных нейронов и нарушению роста аксональных отростков в культуре.

Вклад автора

Все основные результаты были получены автором самостоятельно. Забор крови больного БАС, выделение и заморозка мононуклеарных клеток периферической крови производился на базе научного центра неврологии к.б.н. Ветчиновой А. С. (Научный центр неврологии, г. Москва). Кариотипирование линий ИПСК было проведено к.б.н. Мининой Ю. М. (ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск).

Апробация результатов работы

Результаты данной работы были представлены на семи международных научных конференциях. По теме диссертации были опубликованы четыре статьи в рецензируемых зарубежных журналах и одна глава коллективной монографии.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 29 рисунков и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание изогенных линий ИПСК с внесенными мутациями в гене *SOD1*. Внесение замен в ген *SOD1* осуществляли посредством электропорации ИПСК на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) рибонуклеопротеиновыми комплексами CRISPR/Cas9 и одноцепочечной донорной ДНК согласно рекомендациям производителя (<https://eu.idtdna.com/pages/support/guides-and-protocols>). Анализ клонов ИПСК на предмет целевой замены проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени и tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al. 2001).

Получение ИПСК из мононуклеарных клеток периферической крови человека и их характеристика. Репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови к плюрипотентному состоянию и характеристику плюрипотентного статуса ИПСК проводили согласно протоколам, описанным ранее (Okita et al. 2013, Ustyantseva et al. 2020).

Получение трансгенных линий ИПСК, содержащих встройки последовательностей биосенсоров в локусе *AAVS1*. Встройку последовательностей в локус *AAVS1* осуществляли посредством электропорации ИПСК на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) рибонуклеопротеиновыми комплексами CRISPR/Cas9 и донорными плазмидами по протоколу производителя. Отбор клонов с целевыми встройками проводили с помощью культивирования на селективной среде. Анализ клонов на предмет целевых и нецелевых встроек осуществляли с помощью ПЦР.

Направленная дифференцировка ИПСК в спинальные моторные нейроны. Дифференцировку ИПСК в спинальные моторные нейроны проводили согласно протоколу, опубликованному ранее (Du et al. 2015), с модификациями. Для обеспечения длительного культивирования, незрелые МН на терминальном этапе помещали в слой 33% Matrigel (Corning). Стабильную экспрессию биосенсоров поддерживали посредством регулярного добавления доксициклина в культуральную среду.

Исследование реакции моторных нейронов в ответ на стресс с помощью биосенсоров. Измерение реакции МН в ответ на добавление перекиси водорода в культуральную среду проводили согласно протоколу описанному ранее (Gutscher et al. 2008). Для исследования реакции МН в ответ на эксайтотоксичность, клетки подвергали воздействию глутамата натрия и его ингибитора обратного захвата в течение 6-7 дней, в течение которых производили измерение сигналов биосенсоров.

Статистическая обработка результатов. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Внесение однонуклеотидных замен в ген *SOD1* с помощью системы CRISPR/Cas9

На сегодняшний день еще не было разработано модельных систем, основанных на человеческих клетках, которые позволяли бы сравнивать разные мутации *SOD1* в условиях одинакового генетического фона. Для создания изогенных линий ИПСК, мутантных по *SOD1* мы выбрали варианты замен в кодирующей области гена, которые приводят к изменению аминокислотного состава. Первая замена - с.272A>C – приводит к смене аспарагиновой кислоты на аланин (D90A) – и является одной из наиболее распространенных в европейской популяции (Giannini et al. 2010). Она характеризуется относительно мягкой клинической картиной: средний возраст манифестации симптомов – около 50 лет, больные могут жить с симптомами БАС более 5 лет и у них редко развиваются дополнительные неврологические нарушения помимо моторных (Bali et al. 2017). Другая мутация, с.382G>C, которая приводит к смене глицина на аргинин (G127R), не является распространенной. Тем не менее, она интересна тем, что клинически выражается в агрессивной форме течения заболевания с быстрой прогрессией симптомов и преимущественным вовлечением спинальных МН (Holmøy et al. 2010). Для создания мутантных линий ИПСК была использована линия K7-4 (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A>), полученная ранее в лаборатории эпигенетики развития из клеток периферической крови здорового донора (Malakhova et al. 2020).

Внесение изменений в последовательности генов с помощью CRISPR/Cas9 происходит вследствие репарации CRISPR-индуцированного двуникового разрыва по механизму гомологичной рекомбинации. Для увеличения вероятности обнаружения ИПСК с целевой заменой, мы доставляли компоненты системы CRISPR/Cas9 в виде комплексов белка Cas9 и гибридной crisprPHK:tracrPHK, что значительно повышает вероятность двуникового разрыва в целевом сайте (Kim et al. 2014). В качестве матрицы для гомологичной рекомбинации для внесения замен были использованы одноцепочечные олигонуклеотиды, концы которых были модифицированы фосфотиоатными связями для обеспечения их устойчивости к действию клеточных нуклеаз.

В ходе эксперимента было получено 66 клонов для замены с.272A>C и 112 клонов для замены с.382G>C, которые затем были проанализированы на предмет целевых замен. Для предварительного скрининга клонов перед секвенированием мы использовали методы количественной ПЦР с зондами (для мутации с.382G>C) и tetra-primer ARMS-PCR (для мутации с.272A>C) (Ye et al. 2001), поскольку первый метод оказался недостаточно чувствительным (Рисунок 1а, 2б). Далее, наличие целевых замен подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру.

В результате анализа клонов, полученных после трансфекции CRISPR/Cas9 и донорных одноцепочечных нуклеотидов, был получен ряд линий ИПСК с различными вариантами мутантных аллелей гена *SOD1*: D90A/wt; D90A/del 5; D90A/del 105; D90A/ins 1; G127R/del 5; G127R/del 9; G127R/K128X; G127R/ins 1.

Для дальнейших экспериментов были выбраны линии *SOD1*^{D90A/del105} (*SOD1*-D90A) и *SOD1*^{G127R/K128X} (*SOD1*-G127R). Протяженная делеция в клоне *SOD1*-D90A затрагивает границу интрона и экзона, что ведет к нарушению сплайсинга мРНК, в котором за 3 экзона сразу следует 5 и сдвигу рамки считывания. А наличие стоп-кодона в одном из аллелей клона *SOD1*-G127R приведет к образованию усеченной формы белка *SOD1*, в которой отсутствует необходимый для стабилизации медь-связывающий домен, что, вероятно, также приведет к его быстрой деградации, или агрегации (Рисунок 1в). Наравне с образованием мутантных форм белка, это должно обеспечить более выраженное проявление патологических признаков на клеточной модели. Полученные линии ИПСК являются изогенными по отношению к исходной, здоровой линии K7-4 и по отношению

друг к другу, что исключает влияние генетического фона на результаты исследований этих линий и позволяет сравнивать их между собой. Линии SOD1-D90A и SOD1-G127R также были охарактеризованы на предмет соответствия критериям стволовых клеток по стандартной процедуре (см. далее).

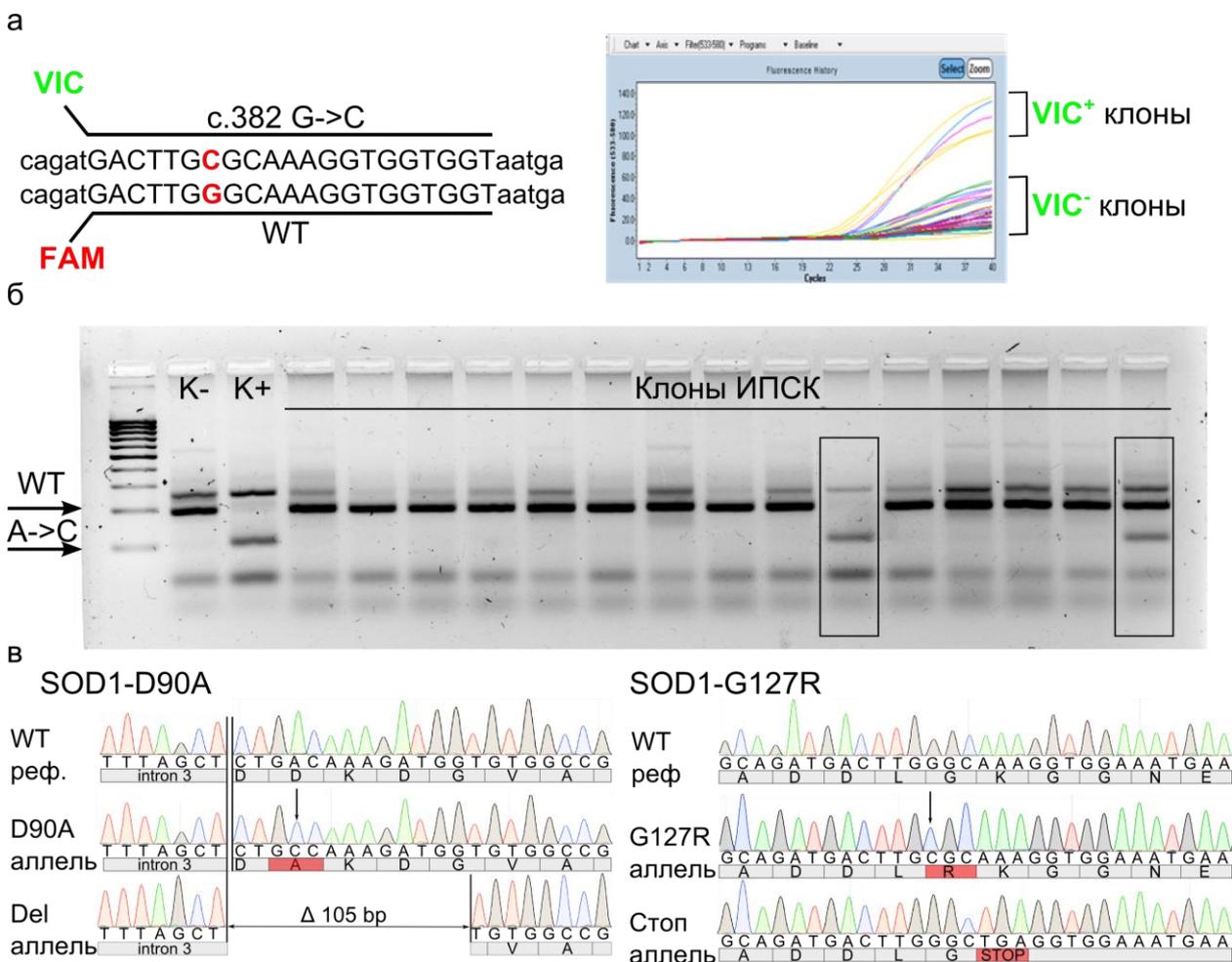


Рисунок 1. Скрининг клонов на предмет замен в гене *SOD1* и секвеннограммы клонов SOD1-D90A SOD1-G127R. а - Выявление клонов ИПСК с заменой с.382G>C (G127R) с помощью количественной ПЦР в реальном времени. В левой части рисунка представлена схема гибридизации ПЦР-зондов, в правой – примеры сигналов, полученных от разных образцов ДНК, на канале пробы VIC, соответствующей замене (клоны с предполагаемой заменой выделены, как VIC⁺); б - Электрофорез ПЦР-продуктов tetra-primer ARMS-PCR для скрининга замены с.272A>C (D90A). WT – обозначение продукта, получаемого с последовательности дикого типа, А->С – обозначение продукта, получаемого с последовательности с заменой. В рамках обозначены клоны, предположительно содержащие целевую замену; в - Секвеннограмма участков экзона 4 (Для SOD1-D90A) и экзона 5 (для SOD1-G127R) гена *SOD1* полученных ИПСК, подтверждающая наличие однонуклеотидной замены в одном из аллелей гена *SOD1*. WT реф. – Электрофореграмма участков экзона 4 и экзона 5 ИПСК линии K7-4.

2. Репрограммирование пациент-специфичных мононуклеарных клеток крови к плюрипотентному состоянию и характеристика полученных линий индуцируемых стволовых клеток

Дополнительно к изогенным линиям ИПСК с внесенными заменами мы получили ИПСК от больного наследственной формой БАС, несущего гомозиготную мутацию с.272A>C в гене *SOD1* (*SOD1*^{D90A/D90A}), которую далее использовали в качестве положительного контроля.

Для получения ИПСК был использован протокол репрограммирования с помощью неинтегрирующихся в геном эписомных векторов, которые временно обеспечивают повышенную экспрессию факторов плюрипотентности (Okita et al. 2013). В результате было получено 2 линии ИПСК, культивирующихся в условиях xeno-free, и 11 линий ИПСК, культивирующихся на слое фидера. Все полученные линии отличались характерной морфологией, схожей с линиями эмбриональных стволовых клеток, интенсивно пролиферировали и экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу. Более детальная характеристика одной из отобранных линий ИПСК также показала наличие экспрессии основных маркеров плюрипотентности, что было подтверждено как с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, так и количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 1а, 1б). Анализ кариотипа показал отсутствие хромосомных перестроек и преобладание диплоидных клеток в культуре (Рисунок 1в). ИПСК также наследовали гомозиготную мутацию в гене *SOD1* (Рисунок 1г). Кроме того, клетки были способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке *in vitro* (Рисунок 1д).

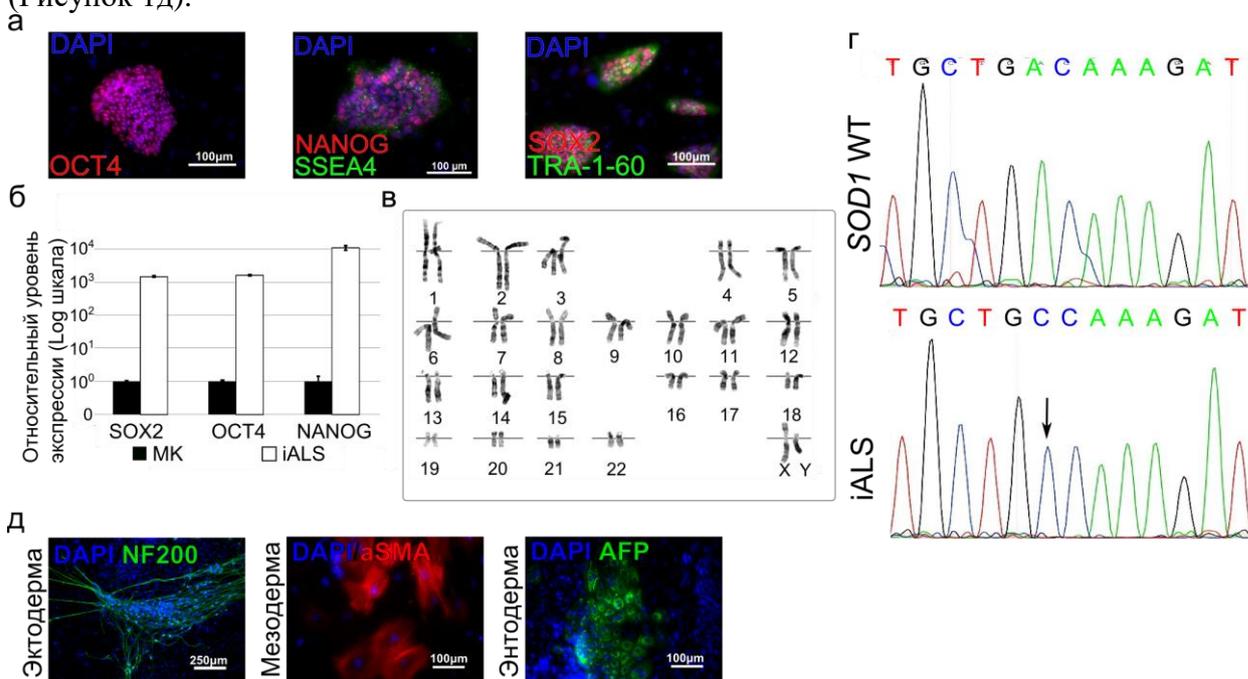


Рисунок 2. Характеристика пациент-специфичных линий ИПСК. а – иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам-маркерам плюрипотентности SOX2, OCT4, NANOG, SSEA4 и TRA-1-60. Ядра окрашены DAPI; б – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов-маркеров плюрипотентности *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*. Значения нормализованы на уровень экспрессии в образце мононуклеаров крови (МК) (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение); в - кариотип линии iALS; г – Секвеннограмма участка экзона 4 гена *SOD1* в здоровых клетках (*SOD1* WT) и полученных ИПСК (iALS), подтверждающая наличие однонуклеотидной замены в ИПСК; д – иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию маркеров производных трех зародышевых листков: энтодермы (AFP), мезодермы (αSMA), эктодермы (NF200) после спонтанной дифференцировки *in vitro*. Ядра окрашены DAPI;

3. Получение трансгенных линий ИПСК, содержащих встройки биосенсоров перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в локусе *AAVS1*

Направленная встройка биосенсоров в специфические локусы генома, называемые «safe harbor», позволяет избежать влияния самого факта встройки на функционирование клетки. Одним из таких локусов у человека является сайт аденоассоциированного вируса – *AAVS1* – расположенный на 19 хромосоме (Kotin et al. 1992).

Используя метод направленного редактирования генов CRISPR/Cas9, мы получили ряд трансгенных линий ИПСК, несущих встройки биосенсоров перекиси водорода – одного

из ключевых участников процесса утилизации АФК – в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) и митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1), в локусе *AAVS1*. Последовательности биосенсоров находятся под управлением системы Tet-On, которая позволяет индуцировать экспрессию желаемых генов путем добавления в среду тетрациклина или его дериватов (доксициклин) (Das et al. 2016).

Для встройки генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-индуцируемой экспрессии биосенсоров, были использованы донорные плазмиды, которые содержат плечи гомологии к локусу *AAVS1*, компоненты системы Tet-On, последовательности биосенсоров и ген устойчивости к неомицину/пурамицину для отбора клонов с целевыми встройками.

Трансгенные линии с встройками были созданы на основе пациент-специфичной линии iALS, линии K7-4 здорового донора, и двух линий с внесенными в *SOD1* мутациями: SOD1-D90A и SOD1-G127R. Для этого, обозначенные клетки трансфицировали посредством электропорации РНП-комплексами Cas9 и направляющей РНК к локусу *AAVS1* и двумя донорными плазмидами: pAAVS1-Neo-M2rtTA + pCyto-roGFP2-Orp1/pMito-roGFP2-Orp1. После, механически отбирали устойчивые к неомицину и пурамицину клоны, отвечавшие на добавление доксициклина в среду возникновением GFP сигнала (Рисунок 3а, 3б).

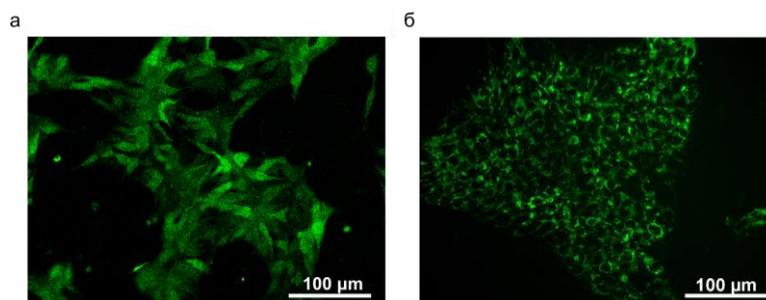


Рисунок 3. Флуоресценция roGFP2 в трансгенных ИПСК линии K7-4. а – сенсор Cyto-roGFP2-Orp1; б – сенсор Mito-roGFP2-Orp1.

Используя ПЦР, мы провели скрининг клонов на предмет наличия обеих целевых встроек в локус *AAVS1*. Поскольку плазмиды имеют тенденцию к случайной интеграции в геном, мы также провели ПЦР-скрининг на предмет дополнительных встроек плазмид. Конечно, такой метод позволяет только предполагать отсутствие дополнительных встроек, однако использование более надежных методов, вроде Саузерн блота и полногеномного секвенирования, в условиях анализа большого количества клонов оказывается неоправданно трудоемким и затратным. Тем не менее, они также могут быть использованы для дополнительной проверки отдельных трансгенных линий при необходимости.

В результате экспериментов по созданию трансгенных линий был получен ряд линий ИПСК: здоровых и мутантных по *SOD1*, содержащих встройки биосенсоров перекиси водорода. Показано, что единственной копии биосенсора, встроенной в геном достаточно для экспрессии на уровне, оптимальном для детекции специфического сигнала. В перспективе, такая система может быть дополнена биосенсорами и других клеточных процессов, что позволит расширить спектр информации, получаемой от данной модели.

4. Направленная дифференцировка ИПСК в спинальные моторные нейроны.

4.1 Получение и характеристика зрелых спинальных моторных нейронов *in vitro*

Современные протоколы направленной дифференцировки позволяют получать очень чистые популяции спинальных МН для исследования в культуре. Однако, общеизвестно, что полученные из ИПСК нейроны имеют фенотип, схожий с неонатальным, поэтому не всегда удается выявить признаки, характерные для исследуемого заболевания, в такой системе. Продолжительное созревание, необходимое МН для достижения состояния, соответствующего взрослому организму, накладывает определенные условия на содержание клеток.

Дифференцировку клеток проводили по протоколу, опубликованному ранее (Du et al. 2015), не прибегая к модификациям на первых этапах. Все клоны ИПСК проходили стадии дифференцировки: от нейроэпителиальных клеток до зрелых МН – без видимых отклонений, с примерно одинаковой эффективностью. Иммунофлуоресцентное окрашивание МН после 10 дней созревания также показало наличие экспрессии основных маркеров зрелых МН: HB9, ChAT и ISL1. Клоны демонстрировали сопоставимый уровень экспрессии м-РНК данных маркеров, а также процент позитивно-окрашенных на ISL1 клеток в культуре (Рисунок 4а), что дает право сравнивать результаты, полученные в экспериментах на этих линиях.

Дополнительно, в ходе получения моторных нейронов, было обнаружено, что не всегда клетки сохраняют экспрессию биосенсора к моменту окончания протокола дифференцировки, причем, это явление не зависит от клона, из которого нейроны были получены. Анализ экспрессии РНК трансгенов показал, что экспрессия трансаktиватора, находящегося под управлением конститутивного СAG-промотора остается на относительно постоянном уровне и не меняется в процессе дифференцировки независимо от режима добавления доксициклина в культуральную среду. Экспрессия биосенсора сохраняется в случае регулярного добавления доксициклина в ходе дифференцировки и созревания МН. Однако добавление доксициклина к уже зрелым нейронам слабо активирует экспрессию биосенсора, что выражается в значимом ослаблении интенсивности флуоресцентного сигнала, что делает невозможным использование биосенсора (Рисунок 4б).

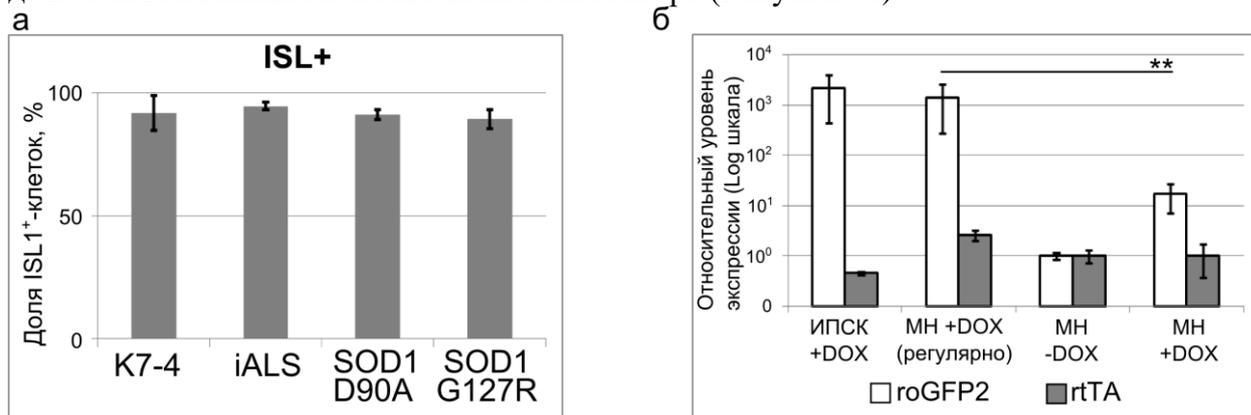


Рисунок 4. Характеристика спинальных моторных нейронов, полученных из разных линий ИПСК. а - Количественная оценка доли ISL⁺ клеток методом проточной цитометрии (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение); б – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции трансгенов: трансаktиватора для доксициклин-зависимой экспрессии (rtTA) и биосенсора (roGFP2). Значения нормализованы на уровень экспрессии в образце МН, не подвергавшихся действию доксициклина (n=6, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение). ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, МН – моторные нейроны, K7-4, iALS, SOD1-D90A и SOD1-G127R – МН соответствующих линий ИПСК.

Таким образом, мы обнаружили, что для клеток, дифференцированных из ИПСК, сайт *AAVSI* не совсем «safe-harbor» локус, поскольку промоторы встроенных в него трансгенов могут подвергаться сайленсингу в процессе реорганизации хроматина, который сопровождает дифференцировку (Klatt et al. 2020). Причем, активная транскрипция препятствует этому явлению, что, вероятно, объясняется недоступностью области для белков ремоделирования хроматина из-за механического связывания активных промоторов с факторами, осуществляющими транскрипцию (Zhu et al. 2007).

4.2 Морфометрический анализ моторных нейронов с внесенными в ген *SOD1* мутациями

Наличие аксона, который по длине может многократно превышать размеры тела – отличительная черта МН, как в организме, так и в культуре. Образование аксона и его поддержание – процессы, требующие большого количества ресурсов, поэтому, часто в клетках, чье функционирование изменено вследствие мутации, построение аксона может нарушаться. Скорость роста отростков в культуре отражает общую функциональную состоятельность нейрона, и может выступать в качестве индикатора патологических изменений.

Измерение длины аксонов на двадцать первый день дифференцировки (второй день созревания) и выявило значимое снижение данного показателя для МН с мутациями в гене *SOD1*, как пациент-специфичных, так и изогенных контролю (Рисунок 5). Средняя длина аксональных отростков контрольных (K7-4) нейронов составила 108 ± 45 мкм против 88 ± 47 мкм для нейронов линии iALS и 85 ± 37 мкм для нейронов линии SOD1-D90A. Примечательно, что снижение длины отростков было еще более выражено (67 ± 30 мкм) для МН линии SOD1-G127R по сравнению с контрольными МН и МН iALS и SOD1-D90A, что, вероятно, отражает более агрессивных характер мутации.

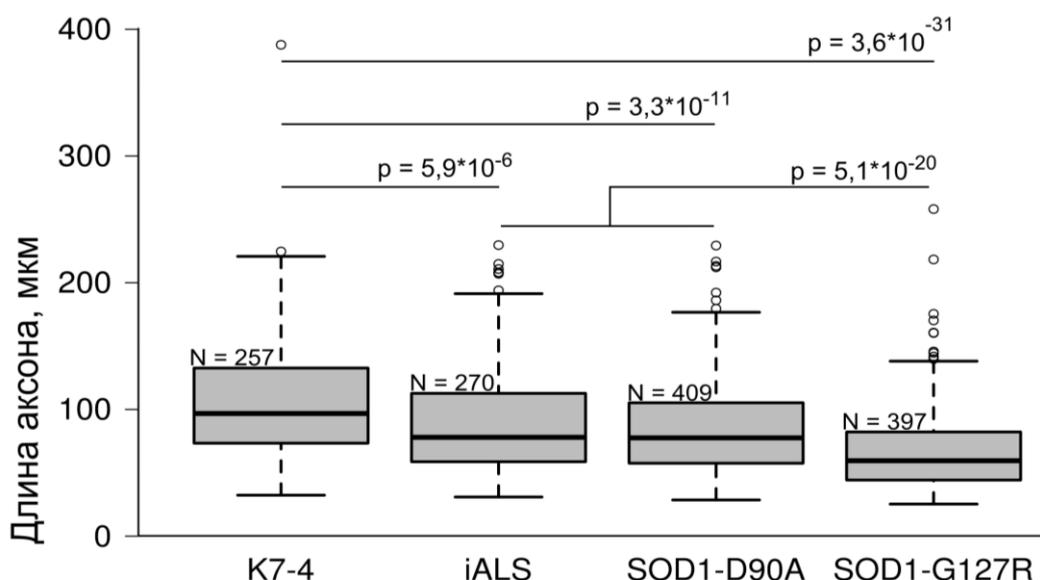


Рисунок 5. Количественная оценка длинны аксонов МН на 21 день дифференцировки. Данные представлены в виде диаграммы box plot, где медиана (50 перцентиль) отмечена в виде линии внутри квадрата, в котором верхняя граница соответствует 75 перцентилю, нижняя – 25 перцентилю. Показаны значения для трех независимых биологических повторов, которые были объединены в одну выборку из-за отсутствия значимых различий (Общее количество проанализированных клеток указано на графике). K7-4, iALS, SOD1-D90A и SOD1-G127R – МН соответствующих линий ИПСК.

5. Функциональная характеристика биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1

5.1 Характеристика базального соотношения GFPox/GFPred

В основе ратиометрических биосенсоров перекиси водорода лежит свойство чувствительного к окислению roGFP2, менять свои спектральные характеристики в зависимости от окисленного/восстановленного состояния двух остатков цистеина в активном центре. Окисленный roGFP2 (roGFP2ox) имеет максимум возбуждения на длине волны – около 405 нм, восстановленный (roGFP2red) – около 488 нм, при сохранении максимума эмиссии. Таким образом, возбуждая клетки поочередно двумя длинами волн, можно получать информацию от каждой из форм roGFP2 в виде сигнала, интенсивность которого может быть измерена. Отношение интенсивностей roGFP2ox и roGFP2red отражает относительный уровень окисления белка roGFP2, который в случае сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 соответствует уровню перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях, соответственно.

Базовая характеристика биосенсора – динамический диапазон, то есть разница между максимально окисленным и максимально восстановленным состоянием, которая определяет общую чувствительность биосенсора. По литературным данным, динамический диапазон биосенсоров перекиси водорода варьирует в пределах от 3 до 8 (Morgan et al. 2011; Panieri et al. 2017). Такой разброс, вероятно, связан с тем, что при использовании классических методов доставки биосенсоров в клетку, сложно контролировать количество его копий. В данной работе, последовательность биосенсора была встроена в геном клеток в единственном экземпляре, поэтому было необходимо убедиться в том, что динамический диапазон остался в пределах нормальных значений.

Для достижения максимально окисленного и максимально восстановленного состояния биосенсора, нейроны были обработаны специфичным окислителем тиоловых групп, диамидом, и восстановителем дитиотреитолом (ДТТ), соответственно. В результате обработки изображений мы получили два типа кривых для обоих сенсоров: кривую окисления и кривую восстановления (Рисунок 6а). Динамические диапазоны для сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 оказались, в среднем, $4 \pm 0,33$ и $3,3 \pm 0,61$, соответственно, что сопоставимо с данными, описанным другими исследователями (Panieri et al. 2017) (Рисунок 6б). Значение динамического диапазона в пределах значений, наблюдаемых ранее, позволяет предполагать эквивалентную степень реакции сенсоров в ответ на специфические раздражители, и, соответственно, возможность использования в исследованиях. Небольшой разброс значений, который существует между линиями, косвенно подтверждает мысль, высказанную ранее по тексту, о том, что количество копий сенсора напрямую влияет на размер динамического диапазона сенсора.

Полученное значение сигнала биосенсора в самом начале временной серии отражает базовый уровень H_2O_2 и исходное состояние клеток на момент начала исследования. Сравнение этих сигналов в МН на 29 день дифференцировки позволило выявить ряд особенностей. Во-первых, в МН, подвергшихся голоданию на дефицитной среде, отмечалось заметное (в 4 раза) повышение уровня перекиси водорода в митохондриях относительно цитоплазмы (Рисунок 6в), тогда, как для МН, находящихся в стандартных условиях, этого замечено не было (Рисунок 6г). Во-вторых, МН линии SOD1-G127R демонстрировали значимое повышение уровня H_2O_2 относительно контроля, как в цитоплазме, так и в митохондриях. Причем, культивирование в условиях дефицита питательных веществ значительно повышало степени окисления, как митохондриального, так и цитоплазматического сенсоров H_2O_2 , что свидетельствовало о тяжелых нарушениях функционирования клеток (Рисунок 6в). Добавление нейротрофических факторов (НТФ) в среду несколько снижало уровень H_2O_2 в цитоплазме МН линии SOD1-G127R на 29 день дифференцировки, но не влияло на митохондриальный уровень H_2O_2 (Рисунок 6д). Дальнейшее культивирование этих МН только усугубляло их состояние: на 32 день

дифференцировки МН демонстрировали еще большее повышение уровня H_2O_2 , и в цитоплазме, и в митохондриях (Рисунок 6е). Причем, влияние НТФ уже перестало быть значимым (Рисунок 6ж). Такая картина заставляет предполагать первично митохондриальную дисфункцию, которая является необратимой. Добавление НТФ ограниченно способствует выживанию МН, но не способно повлиять на процессы в митохондриях, запускающие гибель клетки (Рисунок 6з).

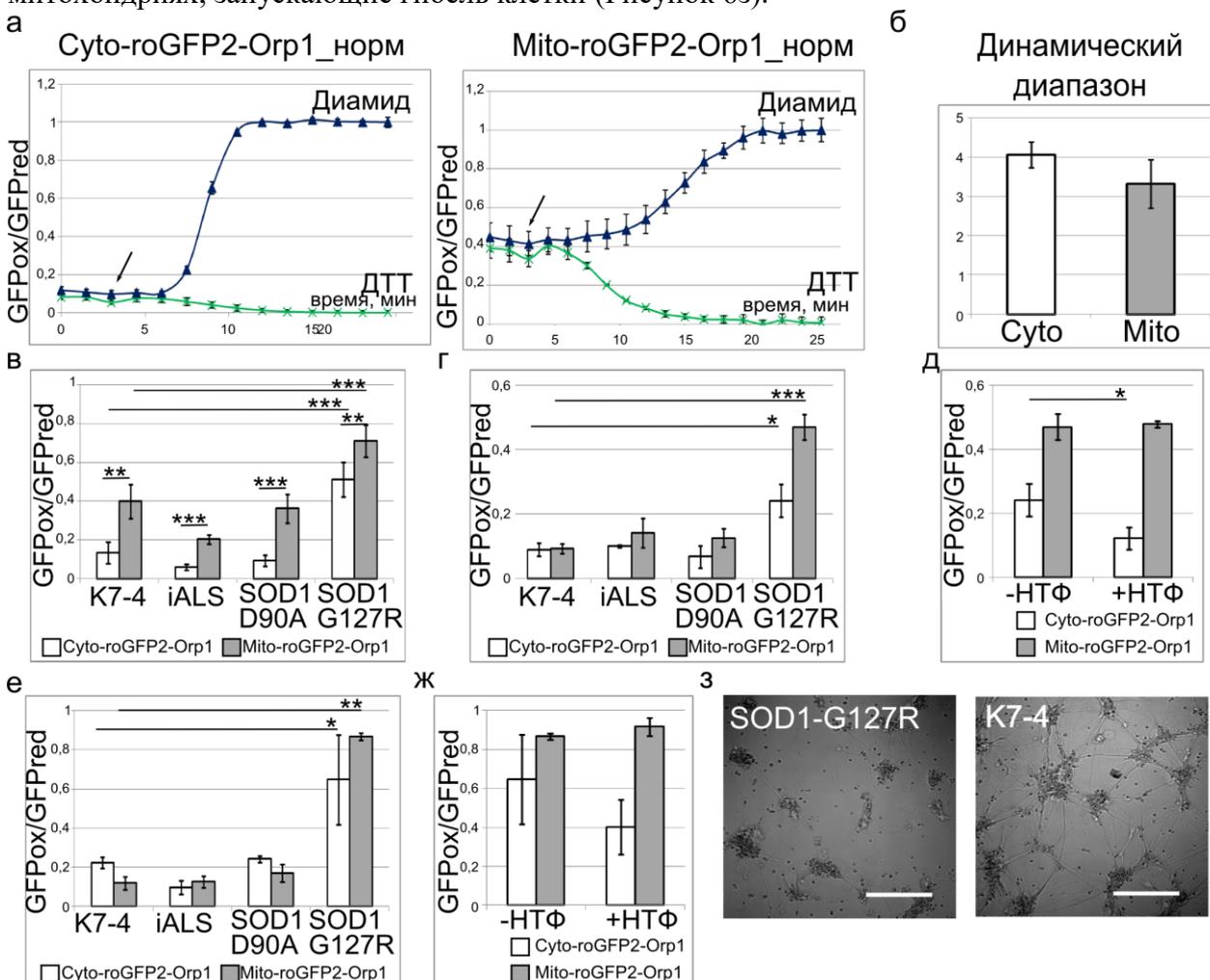


Рисунок 6. Характеристика реакции биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 на окисление/восстановление. Сравнение базовой степени окисления сенсоров МН. а - графики изменения соотношения GFPox/GFPred для биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 (слева) и Mito-roGFP2-Orp1 (справа) в реальном времени после добавления ДТТ/Диамида (показано стрелкой); б - средний динамический диапазон сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 (Cyto) и Mito-roGFP2-Orp1 (Mito) для МН, использованных в работе (n=4, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение); в-ж – степень окисления сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1. в – МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на 29 день в условиях депривации питательных веществ на 24 часа; г – МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на 29 день в стандартной среде для культивирования; д – МН нейроны линии SOD1-G127R на 29 день дифференцировки в зависимости от присутствия нейротрофических факторов (НТФ); е – МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на 32 день дифференцировки в стандартной среде для культивирования; ж – МН нейроны линии SOD1-G127R на 32 день дифференцировки в зависимости от присутствия НТФ; з – морфология МН линий SOD1-G127R и K7-4 на 29 день дифференцировки. Шкала – 200 мкм. N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение), * - p < 0,05, ** - p < 0,005, *** - p < 0,0005.

5.2 Реакция спинальных моторных нейронов в ответ на добавление перекиси водорода в среду

Наличие специфической реакции на перекись водорода – неотъемлемый атрибут Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1. Мы решили протестировать, как эти сенсоры в МН реагируют на добавление H_2O_2 в культуральную среду. Предварительно, на МН мы проверили несколько концентраций H_2O_2 в диапазоне 1мкМ-100мкМ для определения максимально возможного количества H_2O_2 , которое способны обезвредить МН, оставаясь живыми. Остановив свой выбор на 10 мкМ H_2O_2 , мы исследовали реакцию клеток в реальном времени методом временных серий. Делая снимки каждые 3 минуты, мы получали данные об изменении соотношения GFPox/GFPred в течение полутора часов после добавления перекиси водорода.

В целом, форма графика для сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 оказалась предсказуемой: происходило закономерное резкое увеличение соотношения GFPox/GFPred, отражающее увеличение цитоплазматической концентрации H_2O_2 , которое, затем, восстанавливалось до почти исходного значения GFPox/GFPred, что свидетельствует об активной работе системы утилизации H_2O_2 в МН (Рисунок 7а). Однако для Mito-roGFP2-Orp1 нам не удалось получить внятной реакции клеток на H_2O_2 : значения GFPox/GFPred оставались постоянными в течение всего времени наблюдений за нейронами (Рисунок 7а). Для того чтобы выяснить, является ли отсутствие реакции сенсора Mito-roGFP2-Orp1 на 10 мкМ H_2O_2 , следствием недостаточной чувствительности, мы проверили, как клетки с данным сенсором будут реагировать на большие количества перекиси водорода. Добавление H_2O_2 к МН в 25 мкМ и 50 мкМ концентрациях приводило к соответствующим изменениям сигнала, однако также вызывало гибель клеток, что вынудило отказаться от динамических экспериментов с данным сенсором в дальнейшем (Рисунок 7б).

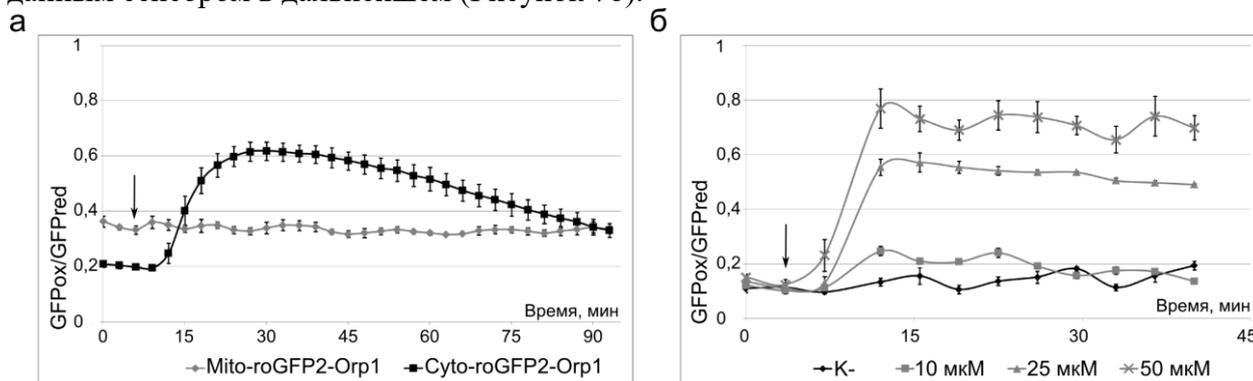


Рисунок 7. Реакция биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 . а – график изменения соотношения GFPox/GFPred биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 ; б – график изменения соотношения GFPox/GFPred биосенсора Mito-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ H_2O_2 . На графиках показано изменение во времени соотношения окисленной и восстановленной формы roGFP2 (GFPox/GFPred) в МН после добавления H_2O_2 в культуральную среду (обозначено стрелкой) в зависимости от типа биосенсора и концентрации H_2O_2 (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

В целом, реакция на добавление перекиси оказалась одинаковой для контрольных МН линии K7-4 и для МН iALS и SOD1-D90A (Рисунок 8а). Дельты максимального изменения сигнала сенсора, а также скорости восстановления клеток не отличались (Рисунок 8б, 8в).

Отличия возникли только для МН линии SOD1-G127R, исходный уровень перекиси в которых был крайне высок, и добавление дополнительной H_2O_2 не приводило к каким-либо значимым изменениям, что заставляет предполагать, что клетки на момент исследования уже были мертвы. Добавление трофических факторов в процессе созревания МН линии SOD1-G127R несколько снижало значение исходного соотношения GFPox/GFPred, однако не влияло на реакцию клеток на H_2O_2 : МН демонстрировали незначительное повышение

соотношения GFPox/GFPred, которое, однако, не сменялось восстановлением, как это происходило в случае МН других линий (Рисунок 8г).

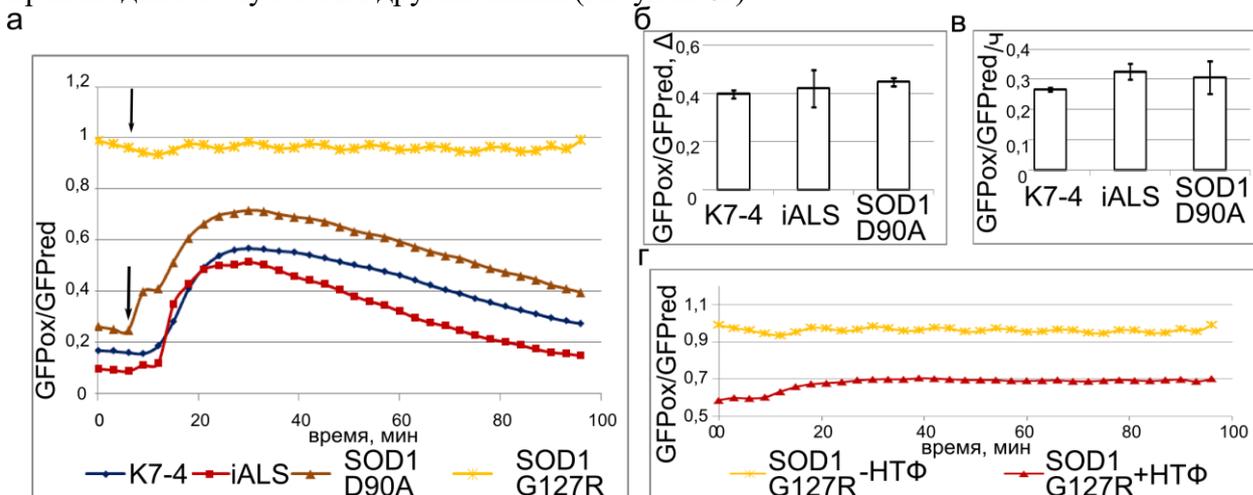


Рисунок 8. Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 МН линий К7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 . а – график изменения соотношения GFPox/GFPred в реальном времени после добавления H_2O_2 (обозначено стрелкой); б – дельта максимального изменения соотношения GFPox/GFPred после добавления H_2O_2 ($n=3$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего); в – значение скорости восстановления клеток после добавления H_2O_2 . Скорость обозначена, как изменение соотношения GFPox/GFPred за 1 час ($n=3$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего); г – график изменения соотношения GFPox/GFPred в реальном времени после добавления H_2O_2 к МН линии SOD1-G127R, культивируемым в стандартных условиях (-HTФ), и в присутствии трофических факторов (+HTФ). Значения графиков реакции биосенсора получены в результате усреднения результатов трех независимых биологических повторов, графики со стандартными отклонениями показаны в Приложении №4 диссертации.

5.3 Индукция хронической глутаматной эксайтотоксичности в моторных нейронах

Глутаматная эксайтотоксичность – один из основных патофизиологических механизмов БАС. Избыточная активация глутаматных рецепторов приводит к усилению тока ионов Ca^{2+} внутрь нейронов, что, в свою очередь, индуцирует апоптоз посредством активации различных ферментов (в том числе, каспаз) и нарушения функции митохондрий. Одно из проявлений дисфункции митохондрий – увеличение продукции АФК, которые дополнительно провоцируют развитие окислительного стресса.

Для того чтобы проверить, могут ли биосенсоры Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 отразить страдания МН, возникающие вследствие развития БАС-ассоциированной дегенерации, мы смоделировали условия хронической эксайтотоксичности, которая имеет место у больных БАС, *in vitro*, культивируя МН с глутаматом натрия ингибитором его обратного захвата (L-транс-пирролидин-2,4-дикарбоновая кислота, ПДК) в течение 5 дней, параллельно производя мониторинг соотношения GFPox/GFPred с помощью биосенсоров. Ввиду того, что МН линии SOD1-G127R погибали вскоре после начала эксперимента из-за общей сниженной жизнеспособности, все дальнейшие результаты показаны для МН, полученных из ИПСК здорового контроля К7-4, пациент-специфичных ИПСК iALS и ИПСК линии SOD1-D90A.

В результате, было обнаружено, что в условиях хронической эксайтотоксичности, и в здоровых и в больных нейронах происходит увеличение соотношения GFPox/GFPred сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 по сравнению с контролем, что свидетельствует о накоплении H_2O_2 в цитоплазме клеток (Рисунок 9а). Для сенсора Mito-roGFP2-Orp1 не удалось увидеть такой же закономерности, несмотря на то, что дисфункция митохондрий напрямую связана с эксайтотоксичностью (Рисунок 9б). Хотя отличия для каждого отдельного клона МН были достоверными, усреднение данных нивелировало значимость эффекта глутамата для

линий K7-4 и iALS, достоверными отличия оказались только для МН SOD1-D90A (Рисунок 9в). При сравнении соотношения показателей сигнала сенсора в зависимости от присутствия/отсутствия глутамата в среде на 5 день также не удалось выявить достоверных отличий между контрольными МН K7-4 и МН iALS и SOD1-D90A (Рисунок 9г).

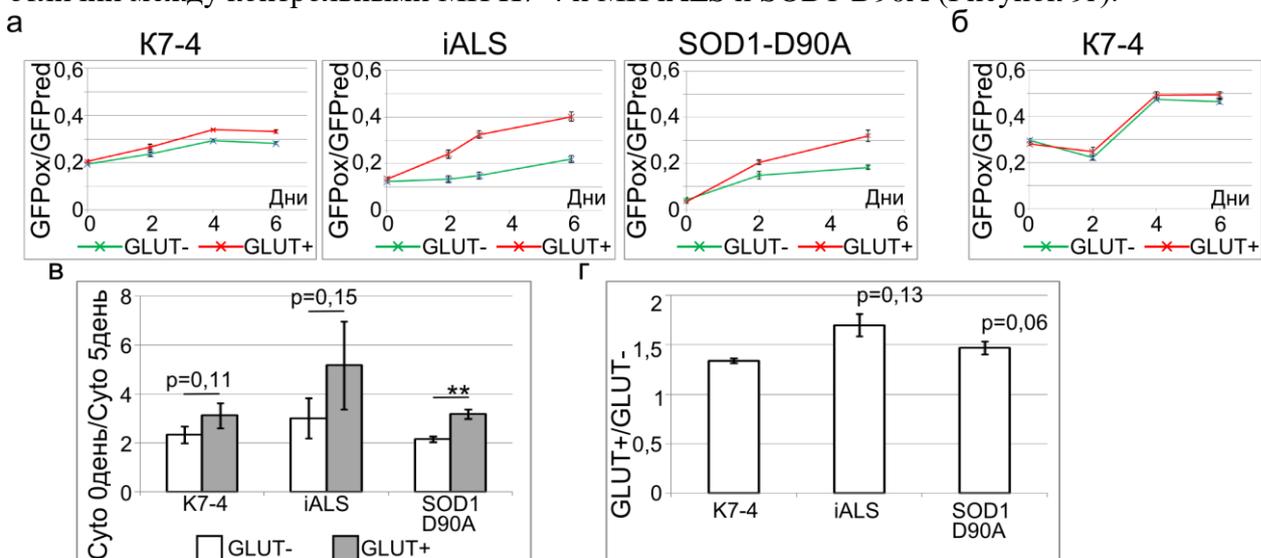


Рисунок 9. Реакция МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на добавление глутамата натрия+ПДК в культуральную среду. а – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 по дням в течение 5-6 дней культивирования МН с глутаматом натрия+ПДК и без глутамата натрия+ПДК (n=5, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); б – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора MitroGFP2-Orp1 по дням в течение 6 дней культивирования МН с глутаматом натрия+ПДК и без глутамата натрия+ПДК, (n=5, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); в – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в зависимости от присутствия/отсутствия глутамата натрия+ПДК в среде на 5 день (нормализованы на значения, зафиксированные на 0 день эксперимента. N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); г – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в присутствии глутамата натрия+ПДК (нормализованы на значения в МН, культивировавшихся без глутамата натрия+ПДК. N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего). ** - p < 0,005

Помимо изменения состояния моторных нейронов мы также исследовали, как глутаматный стресс повлиял на процесс утилизации перекиси водорода, для чего повторили эксперимент с добавлением H₂O₂ в культуральную среду по окончании 5-дневного культивирования МН в среде, содержащей глутамат натрия. В результате мы получили 2 графика реакции для каждого типа МН: тех, которые подвергались хроническому глутаматному стрессу и тех, которые культивировались то же время, но в стандартных условиях (Рисунок 10а-в).

Графики, в целом, не отличались по форме от тех, что были получены ранее для сенсора Cyto-roGFP2-Orp1: резкое увеличение соотношения GFPox/GFPred вскоре после добавления H₂O₂, сменяемое плавным уменьшением соотношения, которое отражает процесс утилизации H₂O₂ и, соответственно, восстановления МН. Не было обнаружено различий в реакции на перекись водорода между экспериментальными и контрольными нейронами: дельта максимального изменения сигнала (Рисунок 10г) и скорость восстановления достоверно не различались, хотя и можно предполагать наличие тенденции к замедлению восстановления в мутантных моторных нейронах (Рисунок 10д).

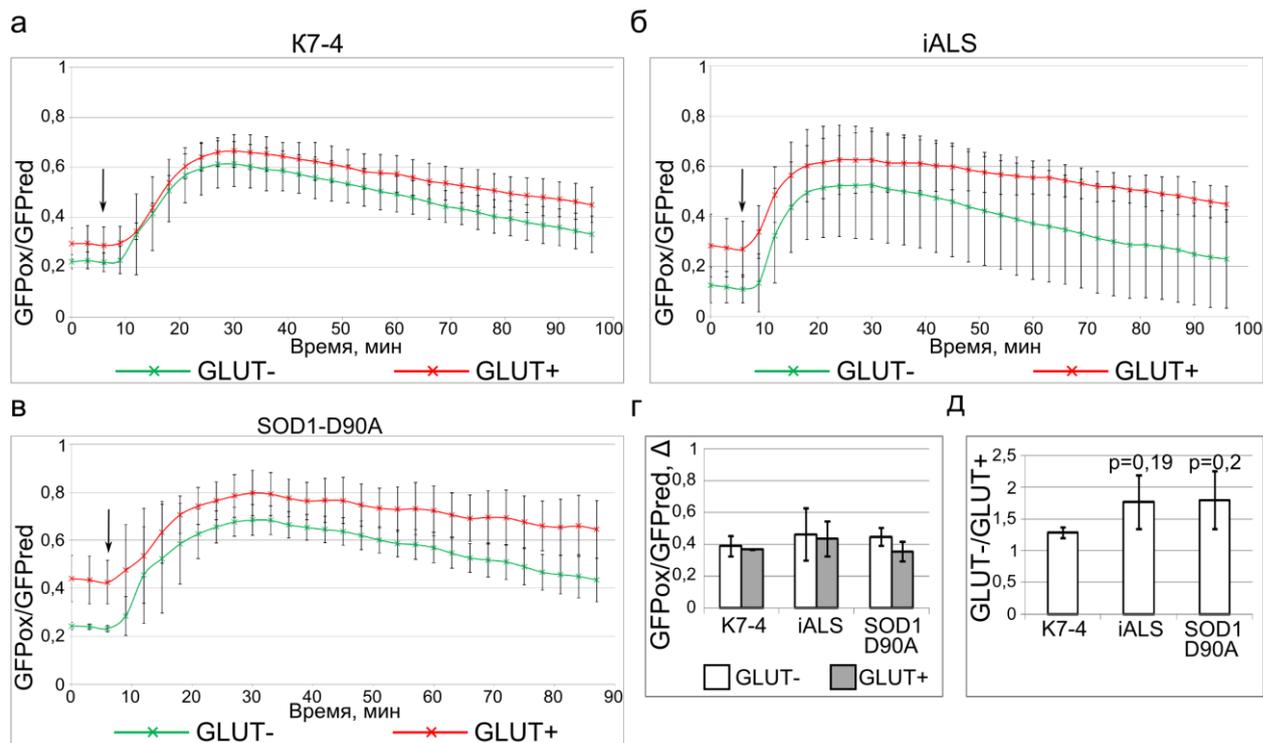


Рисунок 10. Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 мкМ H₂O₂ после 5-тидневного культивирования в среде, содержащей глутамат натрия+ПДК. а-в – графики изменения соотношения GFPox/GFPred в МН линий K7-4, iALS и SOD1-D90A, соответственно, в ответ на добавление 10 мкМ H₂O₂ (отмечено стрелкой) в реальном времени. График зеленого цвета – реакция контрольных МН, культивировавшихся в стандартных условиях, график красного цвета – реакция МН, культивировавшихся с глутаматом натрия+ПДК (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); г – дельта максимального изменения соотношения GFPox/GFPred в ответ на добавление 10 мкМ H₂O₂ (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); д – отношение скорости восстановления МН, культивировавшихся с глутаматом натрия+ПДК, к скорости восстановления контрольных МН (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия первого гена, мутации в котором вызывают боковой амиотрофический склероз – *SOD1* – прошло 27 лет, с момента выхода первого лекарственного средства для лечения БАС – около 25. С тех пор мало, что изменилось для больных этим нейродегенеративным заболеванием. Несомненный успех в исследовании БАС был сделан на трансгенных животных моделях и изучении гистологии и биохимии постмортальных образцов нервной ткани больных. Тем не менее, современные реалии таковы, что данные подходы для исследования БАС не обеспечивают должного объема данных, необходимых для разработки эффективной терапии.

В данной работе была создана клеточная модель бокового амиотрофического склероза на основе индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток. Модель включает в себя, как ИПСК, полученные от больного наследственной формой БАС, так и ИПСК, с мутациями в гене *SOD1*, которые были внесены искусственно с помощью системы CRISPR/Cas9. ИПСК с внесенными мутациями разделяют общий генетический фон друг с другом и здоровой линией ИПСК, из которой они были получены, что повышает точность исследований, поскольку устраняет вероятный вклад индивидуальных генетических особенностей. Встройка последовательностей биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме и

митохондриях сделала возможным исследование полученной клеточной модели с точки зрения проявлений окислительного стресса, как одного из основных маркеров нейродегенерации.

Мы выяснили, что внесенные в ген *SOD1* замены по-разному влияют на функционирование моторных нейронов, что согласуется с различиями в клинической картине, к которой эти мутации приводят. Поэтому полученная клеточная модель может быть использована для исследования роли окислительного стресса в патогенезе БАС. Кроме того, возможность визуализации окислительного стресса с помощью биосенсора позволяет использовать его в качестве маркера состояния нейронов для скрининга потенциальных лекарственных средств в фармакологических и токсикологических исследованиях.

ВЫВОДЫ

- 1) Установлено, что флуоресцентные биосенсоры перекиси водорода в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) и митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1), будучи встроенными в геном в одной копии, продуцируют сигнал детектируемой интенсивности, закономерно изменяющийся в широком динамическом диапазоне.
- 2) Добавление H_2O_2 в культуральную среду в нелетальных для моторных нейронов концентрациях вызывает окисление roGFP2 сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 при отсутствии детектируемых изменений сигнала сенсора Mito-roGFP2-Orp1.
- 3) Моторные нейроны линий iALS (*SOD1*^{D90A/D90A}), SOD1-D90A (*SOD1*^{D90A/del105}) и SOD1-G127R (*SOD1*^{G127R/K128X}) отличаются более низкой скоростью роста аксональных отростков в культуре по сравнению с контролем.
- 4) Депривация питательных веществ на сутки вызывает повышение уровня H_2O_2 в митохондриях моторных нейронов линий K7-4 (*SOD1*^{WT/WT}) iALS (*SOD1*^{D90A/D90A}), SOD1-D90A (*SOD1*^{D90A/del105}) при сохранении прежнего уровня H_2O_2 в цитоплазме.
- 5) Показано, что моторные нейроны линии SOD1-G127R (*SOD1*^{G127R/K128X}) демонстрируют повышение уровня перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях по сравнению с контролем в полноценной среде и в условиях депривации питательных веществ.
- 6) В процессе развития глутамат-индуцируемой эксайтотоксичности происходит повышение уровня H_2O_2 в цитоплазме моторных нейронов. При этом моторные нейроны линий iALS (*SOD1*^{D90A/D90A}) и SOD1-D90A (*SOD1*^{D90A/del105}) не демонстрируют отличий от контроля по степени повышения уровня H_2O_2 при индукции глутамат-индуцируемой эксайтотоксичности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Валетдинова К.Р., **Устьянцева Е.И.**, Елисафенко Е.А., Жарков Д.О., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Инструменты геномной инженерии, предназначенные для создания изогенной модели бокового амиотрофического склероза // Медицинская генетика. 2015. Т. 14. № 6 (156). С. 3-9.
- 2) **Е.И. Устьянцева**, С.П. Медведев, А.С. Ветчинова, Ю.М. Минина, С.Н. Иллариошкин, С.М. Закиян Платформа для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически кодируемых биосенсоров // Биохимия. 2019. Т. 84. №3. С 425-435. doi: 10.1134/S0320972519030126
- 3) **Ustyantseva E.I.**, Medvedev S.P., Vetchinova A.S., Illarioshkin S.N., Leonov S.V., Zakian S.M. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi014-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with homozygous D90A mutation in *SOD1* causing Amyotrophic lateral sclerosis // Stem Cell Res, Vol. 42, Jan 2020, 101675, doi: 10.1016/j.scr.2019.101675
- 4) **Ustyantseva E. I.**, Medvedev S. P., Zakian S. M. Studying ALS: current approaches, effect on potential treatment strategy // Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 1241, May 2020, P 195-217, doi: 10.1007/978-3-030-41283-8_11
- 5) **Устьянцева Е. И.** Внесение трансгенов в safe-harbor локус *AAVS1* генома индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов // Глава в коллективной монографии «Методы редактирования генов и геномов» / Под. ред. С.М. Закияна, С.П. Медведева, Е.В. Дементьевой, В.В. Власова; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ие, Инст-т цитологии и генетики – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2020.