

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦИГ СО РАН)

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Медведев Сергей Петрович

Новосибирск 2021

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Боковой амиотрофический склероз	13
1.1.1. Общие сведения	13
1.1.2 Патологические механизмы развития БАС	14
1.1.3 Современное состояние исследований БАС и текущие стратегии лечения.	25
1.2 Пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как основа для исследования патологических состояний	32
1.3 Использование технологии CRISPR/Cas9 для моделирования патологических состояний и генной терапии	37
1.4 Генетически-кодируемые биосенсоры	41
1.4.1 Биосенсоры окислительно-восстановительных реакций	48
1.5 Заключение	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1 Ростовые среды и условия культивирования	54
2.2 Получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток....	58
2.2.1 Репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови к плюрипотентному состоянию	58
2.2.2 Характеристика плюрипотентного статуса ИПСК	59
2.3 Создание изогенных линий ИПСК с внесенными мутациями в ген <i>SOD1</i> с помощью CRISPR/Cas9	61
2.3.1 Получение и очистка белка Cas9 с сигналом ядерной локализации. Гидролиз ДНК с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов <i>in vitro</i>	61
2.3.2 Доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 в ИПСК с помощью электропорации на приборе Neon Transfection system	62
2.3.3 Анализ клонов на предмет наличия целевой замены	63
2.4 Получение трансгенных линий ИПСК, содержащих вставку последовательностей транскриптора для доксициклин-управляемой экспрессии и биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в локусе <i>AAVS1</i>	65
2.4.1 Доставка компонентов CRISPR/Cas9 и донорных плазмид в ИПСК	65
2.4.2 Селекция ИПСК, содержащих целевые вставки	65
2.4.3 Выявление рекомбинантных клонов при помощи ПЦР	66
2.5 Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны. Исследование поведения моторных нейронов в ответ на стресс с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1	66
2.5.1 Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны	66
2.5.2 Характеристика направленной дифференцировки ИПСК с моторные нейроны	68

2.5.3 Исследование реакции моторных нейронов на добавление H ₂ O ₂ в культуральную среду с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в реальном времени.....	70
2.5.4 Исследование реакции моторных нейронов в условиях хронической эксайтотоксичности с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1.....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	74
3.1 Внесение однонуклеотидных замен в ген <i>SOD1</i> с помощью системы CRISPR/Cas9.....	74
3.1.1 Получение, очистка и функциональный анализ белка Cas9.....	74
3.1.2 Получение линий ИПСК, содержащих замены с.272A>C (D90A) и с.382G>C (G127R) в гене <i>SOD1</i>	76
3.2 Репрограммирование пациент-специфичных моноклеарных клеток крови к плюрипотентному состоянию и характеристика полученных линий индуцируемых стволовых клеток.....	81
3.3 Получение трансгенных линий ИПСК, содержащих встройки биосенсоров перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в локусе <i>AAVS1</i>	84
3.4 Направленная дифференцировка ИПСК в спинальные моторные нейроны.....	88
3.4.1 Получение и характеристика зрелых спинальных моторных нейронов <i>in vitro</i>	89
3.4.2 Получение препаратов живых моторных нейронов для лазерной сканирующей микроскопии.....	90
3.4.3 Изменение экспрессии биосенсора в ходе дифференцировки в спинальные моторные нейроны.....	91
3.4.4 Морфометрический анализ моторных нейронов с внесенными в ген <i>SOD1</i> мутациями.....	93
3.5 Функциональная характеристика биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1.....	94
3.5.1 Подтверждение функциональности биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1. Характеристика базального соотношения GFPox/GFPred.....	94
3.5.2 Реакция биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 на добавление перекиси водорода в среду.....	99
3.5.3 Индукция хронической глутаматной эксайтотоксичности в моторных нейронах.....	103
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	107
4.1 Обоснование подходов, использованных для создания модели БАС.....	107
4.1.1 Внесение однонуклеотидных замен в ген <i>SOD1</i> с помощью CRISPR/Cas9.....	108
4.1.2 Встройка генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-индуцируемой экспрессии биосенсоров, в локус <i>AAVS1</i>	109
4.2 Особенности реакции биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1.....	111
4.3 Влияние мутаций в гене <i>SOD1</i> на функционирование моторных нейронов, полученных из ИПСК.....	114
4.4 Заключение.....	117
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
Приложение 1. Характеристика первичных и вторичных антител, используемых при иммунофлуоресцентном окрашивании.....	143

Приложение 2. Последовательности олигонуклеотидов, зондов и праймеров, использованные в работе	145
Приложение 3. Карты плазмид-доноров для гомологичной рекомбинации.....	148
Приложение 4. Рисунок 23 (Частично). Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 моторных нейронов линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 мкМ H ₂ O ₂ (С планками погрешностей).....	150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BFP – blue fluorescent protein, синий флуоресцентный белок;
- Cas – CRISPR-associated;
- CRISPR– clustered regularly interspaced short palindromic repeats;
- crPHK – crispr PHK;
- C9ORF72 - chromosome 9 open reading frame 72, 72 открытая рамка считывания 9 хромосомы;
- DCTN1 – dynactin subunit 1, субъединица динактина 1;
- FRET – Förster resonance energy transfer;
- FUS – Fused in sarcoma;
- GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок;
- HDR – Homology directed repair, гомологичная рекомбинация;
- RFP – red fluorescent protein, красный флуоресцентный белок;
- SOD1 - Superoxide dismutase 1, супероксиддисмутаза 1;
- TDP-43 – TAR DNA-binding protein 43, TAP ДНК-связывающий белок;
- tracrPHK – транскрипционная crispr PHK;
- АФК – активные формы кислорода;
- БАС – боковой амиотрофический склероз;
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;
- МК – моноклеарные клетки;
- МН – моторный нейрон;
- ОВ – окислительно-восстановительный;
- ПДК - L-транс-пирролидин-2,4-дикарбоновая кислота
- п.н. – пара нуклеотидов;
- т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов;
- ФБ – флуоресцентный белок;
- ЦНС – центральная нервная система;
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум;
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Несмотря на скачок в развитии медицины и фармакологии, существуют заболевания, которые признаны неизлечимыми. Чаще всего, это болезни неизвестной этиологии или обладающие комплексным механизмом патогенеза, который не позволяет обнаружить мишень для фармакологического вмешательства. Это наиболее характерно для нейродегенеративных заболеваний ввиду сложности устройства центральной нервной системы человека и невозможности прижизненного изъятия нервной ткани для изучения. Вследствие увеличения продолжительности жизни и стремительного старения населения, нейродегенеративные заболевания становятся все более распространенными (Alzheimer's Association report, 2017), и актуальность исследования процесса гибели нервных клеток вытекает из высокого риска для обширной группы населения. Тем не менее, поиск патологических особенностей нейродегенеративных заболеваний, потенциальных мишеней для их терапии является колоссально сложной задачей, требующей участия как можно большего количества специалистов: биологов, химиков, медиков и фармакологов.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) находится среди наиболее исследуемых нейродегенеративных заболеваний (Young, 2009). Основным признаком БАС – дегенерация центральных и периферических моторных нейронов, которая приводит к постепенной утрате контроля над мышцами. БАС характеризуется разнообразием клинической картины: на фоне признаков поражения моторных нейронов могут возникать когнитивные нарушения, или болевой синдром, и сама скорость развития дегенерации, равно, как и возраст ее начала – варьируют в широких пределах (Langenhove Van et al., 2012). Только 10% случаев БАС имеют подтвержденную генетическую природу, тем не менее, список генов, мутации в которых запускают патологический процесс, имеет более 100 наименований. Мутации в генах *SOD1*, *FUS*, *TDP43* и *C9ORF72* – наиболее распространены среди больных (Chen et al., 2013; Wijesekera, Leigh, 2009). Несмотря на большую неоднородность БАС с клинической и этиологической точки 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; глутаматная эксайтотоксичность и окислительный стресс. Окислительный стресс особенно интересен: 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 лишний раз подчеркивает роль окислительного стресса в патогенезе заболевания.

В исследовании БАС особенно остро стоит вопрос объекта. Традиционные подходы с использованием постмортальных образцов тканей пациентов, или трансгенных животных не всегда помогают, так как не полностью отражают некоторые аспекты нейродегенерации (Miller et al., 2012). Перспективны в данном случае клеточные модели, которые способны воспроизводить особенности заболеваний и при этом удобны для массового скрининга потенциальных мишеней для лекарственного воздействия.

Поскольку, при БАС специфически страдают моторные нейроны, 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-кодируемые биосенсоры представляют собой известный инструмент для изучения биологических процессов. Они позволяют в режиме реального времени

регистировать молекулы-мессенджеры, метаболиты и активность ферментов в живых системах различной сложности: от культивируемых клеток до трансгенных животных (Bagchi et al., 2007; Enns, Cowan, 2017). На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически-кодируемые биосенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций в живых системах. Одним из способов их применения является исследование таких глобальных процессов, как нейродегенерция.

Цель и задачи исследования

Цель работы – создание и характеристика клеточной модели бокового амиотрофического склероза на основе индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток, несущих встройку генетически-кодируемых 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 мононуклеарных 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 *AIVS1* 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 данные 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 *AAVSI* (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

Список работ по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых журналах:

- 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) **Ustyantseva E.I.**, Medvedev S.P., Vetchinova A.S., Minina J.M., Illarioshkin S.N., and Zakian S.M. Platform for Studying Neurodegeneration Mechanisms Using Genetically Encoded Biosensors // Biochemistry. 2019. Vol. 84. №3. p. 425-435. (Перевод). doi: 10.1134/S000629791903012X

- 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, p. 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, p. 195-217, doi: 10.1007/978-3-030-41283-8_11

Тезисы конференций:

- 1) **Устьянцева Е.И.**, Валетдинова К.Р., Медведев С.П. Создание и характеристика инструментов, предназначенных для внесения мутаций в ген *SOD1*, на основе систем TALENs и CRISPR/Cas9 // Сборник тезисов 19й международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», 2015, Пущино, с. 375. Устный доклад.
- 2) **Устьянцева Е.И.**, Валетдинова К.Р. Создание и характеристика инструментов, предназначенных для внесения мутаций в ген *SOD1*, на основе систем TALENs И CRISPR/Cas9 // Материалы 53-й международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», 2015, Новосибирск, с. 35. Устный доклад.
- 3) Валетдинова К.Р., **Устьянцева Е.И.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Получение модельных систем болезней моторных нейронов на основе плюрипотентных клеток человека // Материалы II Национального конгресса по регенеративной медицине, 2015, Москва, с. 38.
- 4) **Устьянцева Е.И.**, Кулишова Л.М., Медведев С.П., Жарков Д.О., Закиян С.М. Доставка компонентов CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов: новый подход для увеличения эффективности редактирования // Материалы международного конгресса CRISPR-2018, 2018, Новосибирск, с. 50. Устный доклад.
- 5) **Elizaveta Ustyantseva**, Sergey Medvedev, Suren Zakian Development of the stem cell-based platform for studying the neurodegeneration mechanisms using genetically-encoded biosensors // EMBO|EMBL workshop «Precision health: Molecular basis, technology and digital health», 2019 EMBL Heidelberg, Germany, p.103. Poster presentation.
- 6) **Устьянцева Е.И.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Создание клеточной платформы для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически-кодируемых

биосенсоров // Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине, 2019, Москва, с. 237. Постерный доклад.

- 7) **E. Ustyantseva, S. Zakian, S. Medvedev** Application of isogenic stem cell derived motor neurons modified with genetically-encoded biosensors for Amyotrophic lateral sclerosis modeling // the 45th FEBS congress, 2021, Ljubljana, Slovenia.

Главы монографий:

- 1) **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.

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.

Благодарности

Работа была выполнена в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Медведеву С. П. за помощь, оказанную на всех этапах настоящего исследования и заведующему лабораторией д.б.н. Закияну С. М. за поддержку в научных изысканиях и подготовке настоящей работы к защите. Автор искренне благодарит коллектив лаборатории эпигенетики развития за консультативную и практическую помощь при проведении экспериментов, а также за создание здоровой атмосферы, поощряющей развитие молодого научного сотрудника. Также автор благодарит заведующего ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН Байбородина С. И. и заведующего отделом биологии клетки Рубцова Н. Б. за оказанное доверие в работе с оборудованием для микроскопического анализа.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Боковой амиотрофический склероз

1.1.1. Общие сведения

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – заболевание, характеризующееся неотвратимой дегенерацией моторных нейронов (МН), приводящей к параличу и атрофии скелетных мышц, физической иммобилизации и смерти преимущественно от дыхательной недостаточности или ассоциированных состояний. На сегодняшний день, БАС является одним из наиболее изучаемых неврологических расстройств и самым распространенным заболеванием с поражением моторных нейронов в мире с частотой возникновения 2 на 100 000 человек в год (Voillée et al., 2006). Хотя более 90% случаев имеют спорадический характер (сБАС), позволяя предполагать наличие вирусных факторов (Al-Chalabi, Hardiman, 2013), или факторов внешней среды, влияющих на развитие заболевания, оставшиеся 10% имеют доказано генетическую природу. Средний возраст постановки диагноза БАС варьирует в пределах 58-65 лет для спорадической формы, снижаясь до 52 лет в случае наследуемых форм (Logroscino et al., 2010). Средняя продолжительность жизни после диагностирования – 5 лет. Однако характер течения заболевания разнообразен: от более агрессивных ювенильных форм до форм с экстремально низкой скоростью прогрессии, характеризующихся увеличенной продолжительностью жизни.

С клинической точки зрения, главный признак БАС – дегенерация центральных и периферических моторных нейронов, которая выражается, преимущественно, в виде прогрессирующего паралича. Неврологические симптомы включают в себя: спастичность, ригидность мышц, гиперрефлексию, наличие патологических рефлексов (признак патологии центрального МН), а также мышечную слабость и атонию (характерно для поражения периферического МН). Клинически, БАС имеет множество форм, которые различаются по степени вовлечения центральных и периферических МН, возрасту манифестации симптомов, скорости прогрессии и тяжести когнитивных нарушений (Sabatelli et al., 2013). Кроме того, БАС также может быть классифицирован на основании того, в какой анатомической структуре произошла манифестация заболевания, на:

- Бульбарная форма, 25% случаев. Преимущественное вовлечение ядер черепно-мозговых нервов.
- Спинальная форма, 70% случаев. Классический вариант БАС, характеризуется прогрессирующей слабостью скелетных мышц.
- Респираторная форма, 5% случаев. Манифестация в форме дыхательной недостаточности.

На сегодняшний день известно более сотни генов связанных с БАС. Среди них: *SOD1*, *TDP-43*, *FUS*, *C9ORF72* – которые вместе ответственны за развитие большинства случаев наследственной формы БАС, и значительной части sporadicческих случаев. Продукты данных генов вовлечены в ряд базовых клеточных процессов таким образом, что недостаток их функции, равно как и избыток, приводит к развитию патологических симптомов. Среди наиболее известных причин развития дегенерации моторных нейронов при БАС: нарушения гомеостаза белков и метаболизма РНК; дефекты функционирования митохондрий, динамики цитоскелета и аксонального транспорта; аномальный ответ на окислительный стресс и глутаматную эксайтотоксичность. Современный взгляд на развитие патологии БАС предполагает рассмотрение роли данных механизмов через призму не только автономных нарушений, которые могут возникать в самих моторных нейронах, но и учет роли микроокружения и его влияния на процесс инициации и развития патологии (Рисунок 1, см. стр. 23).

1.1.2 Патологические механизмы развития БАС

1.1.2.1 Клеточно-автономные патологические механизмы

Нарушения белкового гомеостаза

Наличие нерастворимых агрегатов неправильно свернутых белков в моторных нейронах является частым признаком БАС, который можно наблюдать уже на самых ранних стадиях развития заболевания (McGoldrick et al., 2013; Parakh, Atkin, 2016; Philips, Rothstein, 2015). Такие белки могут стимулировать патологические процессы вследствие приобретения токсической функции, и/или недостатка их нормальной функции (Ravits et al., 2013; Soo, Atkin, 2015). Следовательно, накопление неправильно свернутых белков может привести к гибели нейронов либо посредством нарушения регуляции белкового обмена, либо путем

выключения важных белков из клеточных процессов (Takalo et al., 2013). Причем, наличие в списке генов, ассоциированных с БАС, тех, которые вовлечены в белковый обмен, лишь подчеркивает общую сложность заболевания (Maurel et al., 2018).

Нейроны особенно чувствительны к нарушению укладки белков из-за специфики формы клеток и их функции. Во-первых, нейроны относятся к терминально дифференцированным клеткам, неспособным к делению; таким образом, у них нет возможности снижать концентрацию токсичных белковых агрегатов, разделяя его между дочерними клетками (Ciechanover, Kwon, 2015). Во-вторых, специфическая форма моторных нейронов (небольшое тело и длинный аксон) только усиливает токсический эффект, поскольку элиминация агрегатов из особо удаленных районов требует дополнительных ресурсов (Hollenbeck, 1993). Так как пассивная элиминация агрегатов посредством деления недоступна для МН, при достижении критической массы начинают включаться активные механизмы удаления агрегатов из клетки: аутофагия, деградация, ассоциированная с эндоплазматическим ретикулумом и убиквитин-зависимая деградация. Будучи исходно протективными, данные механизмы играют важную роль в выживании МН вначале, однако, в условиях хронического стресса (при продолжающемся накоплении агрегатов), их активация может привести к апоптозу (Рисунок 1).

Связь БАС и механизмов, ответственных за поддержание белкового гомеостаза подтверждается рядом фактов. Убиквитин-позитивные включения обнаруживаются в МН почти во всех случаях БАС и, вероятно, играют важную роль в развитии заболевания (Leigh et al., 1991; Urushitani et al., 2002). Кроме того, мутации в нескольких генах, участвующих в процессе убиквитин-зависимой деградации (*UBQLN-2*, *SQSTM-1* и *VCP*), также были отмечены, как ассоциированные с БАС. Та же связь наблюдается и в отношении аутофагии: ряд белков, ответственных за процессы формирования и транспорта аутофагосом, связан с развитием заболевания (Gal et al., 2009). Эксперименты с индукцией аутофагии с помощью трегалозы, показывают, что патологический эффект мутаций в данных генах проявляется вследствие недостатка функции, поскольку активация аутофагии приводит к снижению уровня накопления агрегатов и более поздней манифестации симптомов БАС у трансгенных мышей (Castillo et al., 2013; Zhang et

al., 2014). Аналогичные эксперименты также демонстрируют увеличение выживаемости нейронов и в клеточной модельной системе (Barmada et al., 2014; Ryu et al., 2014).

Клеточные механизмы, обеспечивающие гомеостаз белков, в наибольшей степени интересны для фармакологических исследований, как потенциальные мишени для лекарственного воздействия. Известно, что базальная активность процессов, связанных с утилизацией неправильно свернутых белков, в моторных нейронах находится на относительно низком уровне, и это объясняет их повышенную чувствительность к накоплению агрегатов (Tanaka, Matsuda, 2014; Zhao et al., 2017). Следовательно, терапевтическая активация этих механизмов может быть одним из возможных вариантов коррекции патологического состояния пациентов на ранних этапах заболевания.

Дефекты внутриклеточного транспорта

Вследствие сложной структуры нейронов, внутриклеточный транспорт очень важен, поскольку большое количество процессов происходит на расстоянии друг от друга. Аксональный транспорт, в частности, играет ключевую роль в функционировании МН: доставка белков, органелл и удаление метаболитов из дистальной части аксона. Нарушения внутриклеточного транспорта могут быть вызваны двумя причинами: дефекты транспортных систем, вызванные мутациями транспортных белков с потерей функции, или изоляция белков-переносчиков во включениях. Действительно, мутации в гене *DCTN1*, кодирующем одну из субъединиц динактина – компонента молекулярного мотора – в редких случаях обнаруживают у пациентов с БАС. Эти мутации характеризуются преимущественным поражением периферического моторного нейрона, поскольку он более зависим от аксонального транспорта (Münch et al., 2005). И в культуре клеток, и в трансгенных животных моделях, G59S мутация *DCTN1* вызывает прогрессирующую дегенерацию нейронов вследствие нарушенного везикулярного транспорта, накопления убиквитинированных включений и аномальной морфологии ЭПР (Laird et al., 2008; Münch et al., 2004; Puls et al., 2003).

Другая сторона дефектов транспорта, ассоциированных с БАС, проявляется и в модельных системах с мутантным SOD1, где неправильно свернутый SOD1 связывает и ингибирует белки – молекулярные моторы, ответственные за

ретроградный и anterogradный транспорт – динеин и кинезин-ассоциированные белки (Ligon et al., 2005; Tateno et al., 2009). Таким образом, МН неспособны поддерживать нормальное функционирование, что приводит не только к их гибели, но и денервации мышечных клеток, которые они питают, и, следовательно, атрофии последних (Рисунок 1).

Нарушения метаболизма РНК

Нарушения метаболизма РНК считают одной из основных причин нейродегенерации. Термин «метаболизм РНК» подразумевает совокупность процессов, связанных с трансляцией, модификацией, транспортом РНК, а также их регуляцию. В целом, нарушения любого из этих процессов вследствие недостатка функции (loss-of-function), или избытка функции (gain-of-function), могут вызывать патологию, ассоциированную с БАС. Среди генов, ассоциированных с БАС, немало тех, что кодируют белки с РНК-связывающим доменом: *TDP-43*, *FUS*, *ANG*, *C9ORF72* – что свидетельствует о доминантной роли «loss-of-function» механизма в развитии патологии.

TDP-43 и *FUS* кодируют белки с РНК-связывающим доменом, которые имеют преимущественно ядерную локализацию (Ling et al., 2013). Главная их функция – регуляция транскрипции и сплайсинга пре-мРНК. Причем, среди их мишеней были обнаружены тысячи различных генов, в том числе и те, которые были ассоциированы с нейродегенерацией ранее (Lagier-Tourenne et al., 2012; Polymenidou et al., 2011). Таким образом, нарушение функционирования *TDP-43* и *FUS* приводит изменению экспрессии множества генов и aberrantному сплайсингу РНК (Lagier-Tourenne et al., 2012; Ling et al., 2013; Polymenidou et al., 2011).

Хотя *TDP-43* и *FUS* по большей части расположены в ядре, что связано с их РНК-ассоциированными функциями, они могут транспортироваться в цитоплазму вместе с РНК, в виде транспортных рибонуклеопротеиновых гранул, и служить в качестве переносчика РНК в определенные компартменты клетки (например, аксон), где она должна быть транслирована (Ayala et al., 2008). Это особенно важно для нейронов, в которых синтез белка часто происходит на значительном удалении от ядра, например, в терминальных частях аксонов (Alami et al., 2014; Fallini et al., 2012; Ling et al., 2013). Мутации в *TDP-43* действительно нарушают аксональный транспорт м-РНК, влияя на мобильность аксонов, их регенерацию,

рост и формирование синапсов (Alami et al., 2014; Donnelly et al., 2013; Liu-Yesucevitz et al., 2011) (Рисунок 1).

Особую роль в патогенезе БАС играет посттранскрипционное редактирование РНК ADAR (adenosine deaminases acting on RNA)-белками. В этом процессе аденозин в РНК заменяется на инозин, который затем транслируется, как гуанин, что приводит к изменению аминокислотной последовательности белка (Seeburg, 2002). В контексте БАС важно отметить, что одной из мишеней ADAR-редактирования является одна из субъединиц Ca-зависимого рецептора глутамата (GluR2). Известно, что до 100% пре-мРНК GluR2 подвергается редактированию ADAR (Puchalski et al., 1994), что приводит к снижению проницаемости каналов рецептора для Ca^{2+} . Снижение уровня посттранскрипционного редактирования GluR2 приводит к увеличению чувствительности клетки к Ca^{2+} -зависимой глутамат-индуцируемой эксайтотоксичности (Brusa et al., 1995). Неясно, является ли неполное редактирование РНК GluR2 первичной причиной гибели нейронов, или следствием других процессов, которое только усиливает чувствительность клеток к стрессу. Тем не менее, спинальные МН, полученные из посмертных образцов спинного мозга больных БАС, демонстрируют преобладание нередктированных форм GluR2 и значительное снижение активности ADAR, что говорит о важной роли данного процесса в патогенезе БАС (Hideyama et al., 2012; Kawahara et al., 2004).

Окислительный стресс и эксайтотоксичность

Организмы в течение жизни постоянно подвергаются воздействию активных форм кислорода (АФК). В небольшом количестве, АФК действуют в качестве сигнальных молекул. Однако повышение их концентрации в результате увеличения продукции, или снижения скорости их утилизации может приводить к возникновению окислительного стресса. Результатом окислительного стресса становится окисление липидов и белков, а также повреждение ДНК, что позволяет рассматривать его как основной компонент метаболических расстройств и старения (Breus, Dickmeis, 2020). Основная масса АФК в клетке образуется как побочный продукт в реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях. Моторные нейроны являются клетками с высокими энергетическими потребностями, что предполагает активную работу митохондрий и, как следствие,

образование большого количества АФК. Необходимость удовлетворения энергетических потребностей МН в условиях патологии приводит к быстрому накоплению кислородных радикалов, что делает МН особенно подверженными окислительному стрессу. Как потенциальный механизм развития БАС, окислительный стресс был открыт десятилетия назад, в 1993 году, когда был обнаружен первый ген, связанный с развитием БАС – *SOD1*, кодирующий антиокислительный белок – Cu-Zn супероксиддисмутазу. Хотя, современный взгляд на патологию БАС не признает потерю основной функции *SOD1* вследствие мутаций в качестве возможной причины окислительного стресса МН, сам процесс имеет место быть, поскольку признаки поражения нейронов, вызванные окислительным стрессом, были обнаружены как на *in vitro* моделях, так и у больных БАС, что доказывает важность данного процесса в развитии заболевания (Bosco et al., 2010a; Weiduschat et al., 2014).

Окислительный стресс стоит несколько обособленно в структуре БАС, поскольку он тесно связан с другими патологическими механизмами и может быть как их следствием, так и причиной. С одной стороны, накопление АФК приводит к нарушению укладки белков, с тенденцией к образованию перекрестных сшивок, что приводит к накоплению агрегатов, устойчивых к протеолитической деградации (См. Нарушения белкового гомеостаза) (Barber, Shaw, 2010; Grune et al., 2003). С другой стороны, стресс эндоплазматического ретикулума, который возникает в ответ на накопление большого числа неправильно процессированных белков, сам приводит к повышению концентрации АФК (Haynes et al., 2004). Косвенно, нарушение созревания белков также влияет и на организацию цитоскелета МН: окисление легких субъединиц нейрофиламента (NF-L) нарушает сборку филаментов более высокой степени организации, и приводит к накоплению агрегатов NF-L (Kim et al., 2004). Окисление как мутантного *SOD1*, так и *SOD1* дикого типа приводит к нарушению формирования димеров (нормальное состояние) и агрегации *SOD1* (Valentine, Hart, 2003), что не только создает дефицит одного из ключевых компонентов антиокислительной системы клетки, но и провоцирует нарушения других клеточных процессов (см. Дефекты внутриклеточного транспорта) (Ezzi et al., 2007). Представляет интерес также то, что пролонгированный окислительный стресс может приводить к дисфункции

митохондрий, в результате чего количество АФК только увеличивается (Grosskreutz et al., 2010; Vargas et al., 2011).

Примечательна взаимосвязь между эксайтотоксичностью и окислительным стрессом. Глутамат является одним из основных возбуждающих нейромедиаторов центральной нервной системы. Однако аномальная активация глутаматных рецепторов, или повышение концентрации глутамата в синаптической щели может приводить к чрезмерному притоку ионов Ca^{2+} в нейрон и его перевозбуждению, что получило название – эксайтотоксичность. Гипервозбудимое состояние МН при БАС обусловлено двумя факторами. Во-первых, селективной чувствительностью данного типа клеток, которая возникает вследствие особенностей экспрессии отдельных субъединиц глутаматного рецептора (Corona, Tapia, 2004), а также степени выраженности посттранскрипционного редактирования мРНК субъединицы GluR2 (см. Нарушения метаболизма РНК). Во-вторых, низким базовым уровнем экспрессии белков, связывающих ионы Ca^{2+} (Grosskreutz et al., 2010). Таким образом, увеличение проницаемости рецептора вследствие изменения его субъединичного состава, или увеличение количества рецепторов на мембране при повышенном уровне глутамата в синаптической щели приводит к быстрому росту цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} . В отсутствие буферных систем для Ca^{2+} в цитоплазме, большая часть ионов направляется в митохондрии, что, в конечном итоге, также приводит к нарушению их функции.

В этом месте, пересекаются пути сразу нескольких патологических механизмов, которые приводят к гибели нейронов. Так, известно, что агрегаты SOD1 способны накапливаться в митохондриях, влияя на работу цепи переноса электронов (Kausar et al., 2018). А агрегаты другого белка, ассоциированного с БАС – FUS – индуцируют фрагментацию митохондрий (Deng et al., 2015). Кроме того, транспорт митохондрий затруднен в направлении от тела к отросткам (см. Дефекты внутриклеточного транспорта), что приводит к снижению количества митохондрий в пресинаптических окончаниях и, как следствие, дефициту энергии (Millecamps, Julien, 2013). Все вместе, позволяет предполагать, что митохондрии моторных нейронов уже скомпрометированы и дополнительная загрузка ионами Ca^{2+} приводит к гибели клетки (Рисунок 1).

1.1.2.2 Неавтономные патологические механизмы

Эффект окружения. Астроциты

Роль астроцитов в дегенерации МН во время БАС была обнаружена сравнительно недавно и в настоящее время рассматривается в качестве одного из основных факторов развития патологии. Поскольку основная функция астроцитов состоит в физической и физиологической поддержке нейронов, очевидно, что потеря данных функций ведет к гибели МН. Предлагалось множество механизмов потенциального влияния поврежденных астроцитов на МН; например, нарушение экспрессии рецепторов или метаболизма нейротрансмиттеров, изменение в процессах синтеза и высвобождения цитокинов, усиление генерации АФК (Damme et al., 2007). Для того чтобы продемонстрировать токсическое влияние астроцитов на моторные нейроны, были разработаны различные модели: основанные на сокультивировании астроцитов и МН, или обработке МН кондиционированной на астроцитах средой. Оба типа экспериментов подтвердили наличие токсического эффекта мутантных по *SOD1* астроцитов на МН. Более того, этот эффект наблюдался только при сокультивировании астроцитов и МН, и никаких других типов нейральных клеток (Giorgio Di et al., 2007; Nagai et al., 2007). Позже это было показано уже и на животных моделях (мышь и крыса), в которых мутантные астроциты индуцировали дегенерацию МН и способствовали прогрессированию заболевания (Paradeas et al., 2011; Yamanaka et al., 2008).

Известны механизмы нейродегенерации, ассоциированные, наоборот, с потерей поддерживающей функции астроцитов, а не с их токсичным воздействием. Например, мутантные по *SOD1* астроциты индуцируют дегенерацию МН частично через уменьшение метаболической поддержки и активацию апоптотического сигнального пути рецептора p75 (Ferraiuolo et al., 2011). Помимо этого, мутантные по *SOD1* астроциты в модельной системе также приводят к дисфункции митохондрий и продукции большого количества АФК, что, в свою очередь, является причиной дегенерации МН (Cassina et al., 2008; Fritz et al., 2013; Rojas et al., 2015). Недавние исследования также обнаружили вклад, который оказывают астроциты в функционирование основных клеточных процессов в моторных нейронах: гомеостаз белка и регуляция апоптоза. Так, длительное сокультивирование астроцитов, полученных от больного БАС, с моторными

нейронами *in vitro* приводит к накоплению нерастворимых включений в цитоплазме последних, что связано с нарушениями аутофагии (Madill et al., 2017; Tripathi et al., 2017) (Рисунок 1).

БАС и микроглия

Нейровоспаление, характеризующееся экспансией активированной микроглии и Т-лимфоцитов, инфильтрирующих ЦНС, известно как один из отличительных признаков БАС (Henkel et al., 2004). Активация микроглии в процессе прогрессирования БАС обеспечивает ряд локальных изменений микроокружения: изменение числа и морфологии клеток, экспрессии рецепторов, продуцирование факторов роста и цитокинов, которые могут оказывать как протективное, так и вредоносное воздействие (Saijo, Glass, 2011). Существует два типа активации микроглии. Первый ведет к образованию M1-активированной микроглии, экспрессирующей ряд провоспалительных цитокинов, которые способствуют гибели нейронов. Второй приводит к образованию M2-активированной микроглии, которая продуцирует нейротрофические ростовые факторы. Преимущественный тип активации зависит от текущего состояния иммунной системы, которая способствует активации по одному из вариантов, таким образом, определяя исход для МН.

Известно, что активированная микроглия часто появляется в ЦНС еще до первых признаков нейродегенерации, что позволяет предположить ее возможную поддерживающую роль на первоначальных этапах развития заболевания (Gerber et al., 2012), которая затем, наоборот, становится вредоносной на более поздних стадиях БАС, ухудшая состояние МН (Boillee et al., 2006). Недавние эксперименты на мутантных по *SOD1* мышинных моделях показали повышенную активацию ряда нейротоксичных цитокинов (NF- κ B, TNF α) в микроглии, которые, как известно, нарушают нормальное функционирование МН, способствуя развитию воспалительной реакции (Frakes et al., 2014; Liu et al., 2009; Ryu et al., 2011) (Рисунок 1). Из-за плохо известной роли микроглии в норме и при патологии и общей сложности межклеточных взаимодействий в ЦНС, детальные механизмы влияния микроглии на МН неизвестны. Однако, современные техники позволяют изучать ЦНС на все более сложном уровне, делая возможными дополнительные исследования молекулярных механизмов БАС.

Прионоподобное распространение агрегатов при БАС

Накопление агрегатов неправильно свернутых белков – это внутриклеточный процесс, ассоциированный преимущественно с нарушением механизмов их деградации, что классифицирует его, как клеточно-автономный механизм развития БАС. Тем не менее, недавние исследования позволяют говорить о наличии прионоподобной трансмиссии этих агрегатов от клетки к клетке, что усложняет классификацию данного процесса в структуре механизмов развития БАС, делая его одновременно и клеточно-автономным, и неавтономным. Прионоподобное распространение неправильно свернутых белков в ЦНС давно известно в качестве одного из основных признаков нейродегенеративных заболеваний в целом, хотя чаще его рассматривают в контексте изучения болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона (Ma et al., 2019). Ключевое событие в данном процессе – первичная агрегация неправильно свернутых белков с последующим вовлечением в агрегаты белков с нормальной структурой. В случае БАС такой тип поведения белков был впервые обнаружен для мутантного SOD1 (Grad et al., 2011; Münch et al., 2011).

Определение способности мутантной формы SOD1 к агрегации *in vitro* показало, что SOD1 способен индуцировать самоагрегацию как мутантных форм, так и нативных форм SOD1 независимо от значений pH (Chia et al., 2010; Hwang et al., 2010). Дополнительные исследования на клеточных моделях не только подтвердили эту особенность мутантного SOD1, но также показали, что данные агрегаты могут перемещаться из клетки: мутантный SOD1 был обнаружен в кондиционированной среде, а также в экзосомах от мутантных по *SOD1* мышинных астроцитов (Basso et al., 2013). Недавно связь между передачей мутантного SOD1 и дегенерацией МН была продемонстрирована *in vivo*. В данном исследовании гомогенаты спинного мозга от различных трансгенных *SOD1* моделей инъецировали в спинной мозг здоровых мышей, что приводило к гибели МН (Ayers et al., 2014). Примечательно, что гомогенаты спинного мозга реципиентов, при инъекции новым мышам, также вызывали появление признаков БАС (Ayers et al., 2014).

Прионоподобное распространение белков в нервной системе, несомненно, имеет место в патогенезе развития болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

Однако роль данного механизма в распространении дегенерации МН при БАС еще необходимо тщательно изучать.

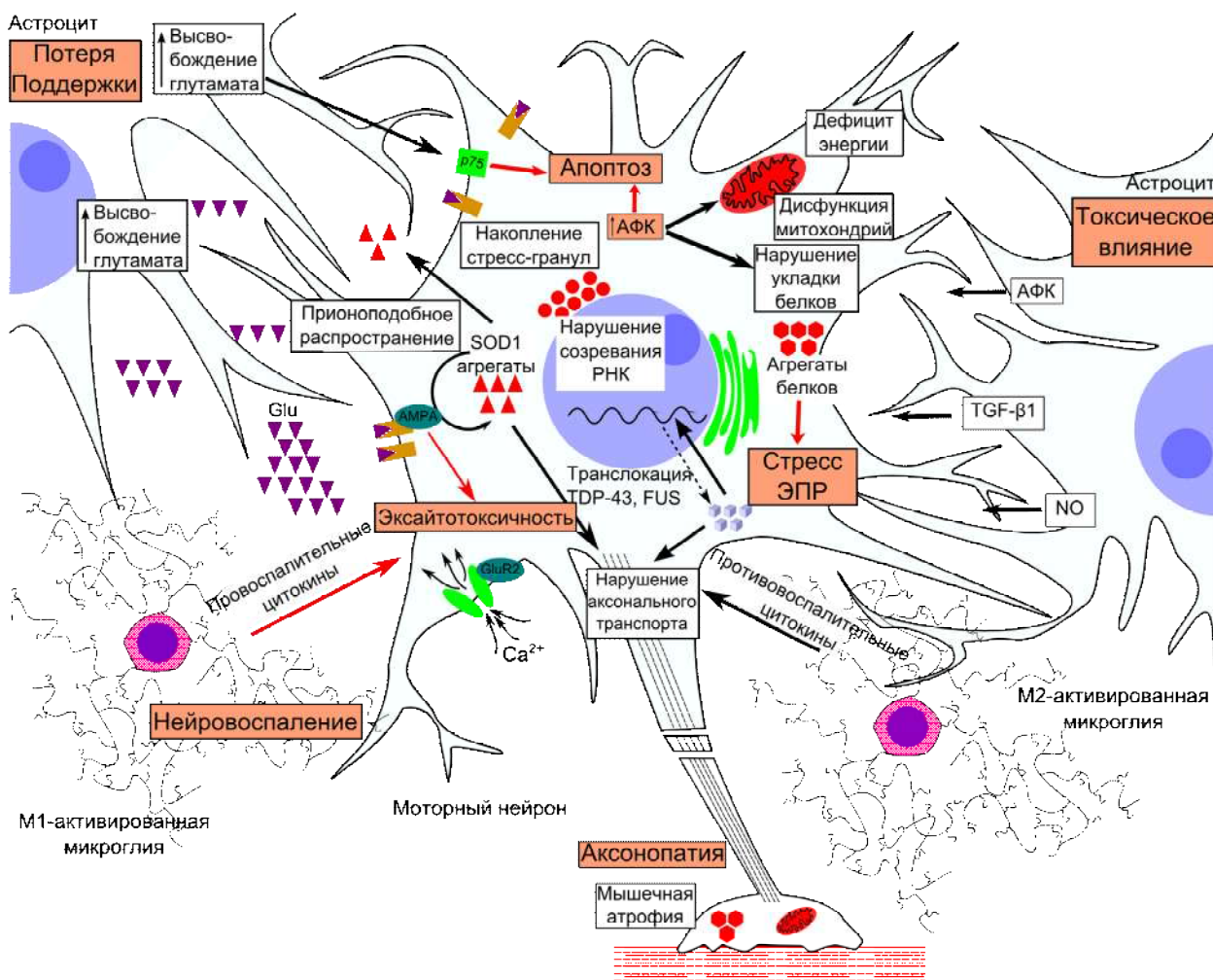


Рисунок 1. Механизмы дегенерации моторных нейронов при боковом амиотрофическом склерозе. В красных блоках – отличительные патологические признаки БАС. АФК – активные формы кислорода, NO – оксид азота, Glu – глутамат, ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Подробное объяснение в тексте.

Годы исследований процессов, приводящих к гибели моторных нейронов при боковом амиотрофическом склерозе, не позволили сформировать четкой картины заболевания. Очевидно, что не последнюю роль в развитии БАС играет особенная уязвимость моторных нейронов, обусловленная их строением и функцией. Моторные нейроны не способны долго противостоять стрессовым факторам и поддерживать прежний уровень жизнедеятельности, что приводит к срыву адаптации. Провести границы между различными процессами, которые инициируют, или возникают вследствие болезни, сложно, поскольку они тесно взаимосвязаны, особенно, на поздних стадиях заболевания. Тем не менее, вне зависимости от того, какой клеточный механизм был нарушен изначально,

результат этих нарушений часто универсален: нарушение синтеза белков, дисфункция митохондрий и окислительный стресс. Данные процессы особенно важны в контексте потенциальной терапии не только БАС, но и других нейродегенеративных заболеваний, так как могут служить неспецифическими мишенями для фармакологической коррекции, а также маркерами состояния клеток.

1.1.3 Современное состояние исследований БАС и текущие стратегии лечения.

1.1.3.1 Модельные системы для изучения БАС

Современные исследования БАС базируются на двух основных подходах: анализ тканей нервной системы пациентов и моделирование заболевания в различных системах. Поскольку БАС – хроническое заболевание, поражающее, по большей части, центральную нервную систему (ЦНС), изучение посмертных образцов остается единственной опцией для исследователей. С одной стороны, ткани человека полностью воспроизводят микро- и макроструктуру ЦНС. С другой стороны, с их помощью можно исследовать заболевание только на поздних стадиях, позволяя идентифицировать результат, а не последовательность патологических событий, которая ему привела. Несмотря на данные недостатки, посмертные образцы тканей человека все еще полезны для исследователей БАС: они позволяют оценивать вклад общего старения – одного из больших факторов риска для БАС – в развитие патологии (Soreq et al., 2017; Zhang et al., 2016). Более того, современные методы позволяют культивировать определенные типы клеток, выделенные из посмертных образцов, что позволяет изучать неавтономные механизмы (Haidet-Phillips et al., 2011; Re et al., 2014).

Хотя подавляющее большинство случаев БАС являются спорадическими, описание первого гена – *SOD1* – мутации в котором ассоциированы с развитием БАС, значительно обогатило знание исследователей относительно патогенеза данного заболевания. Исторически, трансгенные *SOD1* животные модели были первыми, созданными в лаборатории (Gurney et al., 1994). И большая часть информации о молекулярных и клеточных механизмах развития заболевания была получена именно с их помощью.

Ряд нарушенных при БАС процессов можно отнести к категории базовых клеточных функций, консервативных с эволюционной точки зрения, что делает возможным их изучение на относительно простых организмах: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Danio rerio*. Одним из основных преимуществ данных систем является: высокая скорость воспроизводства, простое и дешевое содержание и возможность проведения широкомасштабных скринингов.

Несмотря на простоту, в нервной системе *C. elegans* обнаружено большинство известных для млекопитающих нейротрансмиттеров. Синаптические взаимодействия *C. elegans* хорошо охарактеризованы, что делает этот организм подходящей моделью для изучения клеточных механизмов неврологических расстройств, таких как БАС. В первых моделях БАС на *C. elegans* экспрессировался мутантный вариант человеческого SOD1 и было показано его влияние на моторную функцию: черви в данных исследованиях демонстрировали повышенную чувствительность к стрессовым факторам и локомоторные нарушения, которые имели прямую корреляцию с возрастом, а также накопление агрегатов мутантного SOD1 в нейронах и мышечных клетках (Li et al., 2013; Oeda et al., 2001; Wang et al., 2009).

D. melanogaster – один из основных модельных организмов в классической генетике. Вследствие высокой степени его изученности, он представляет собой ценный объект для экспериментов по редактированию генома для различных целей, в том числе и для изучения патологического влияния различных мутаций в интересующих генах. За последние годы, используя технологии трансгеноза и направленного редактирования генома, исследователи разработали ряд модельных линий *D. melanogaster*, экспрессирующих патологические варианты *SOD1*, *TDP-43*, *FUS* и *C9ORF72* человека (Casci, Pandey, 2015). Данные модели, также как и модели на *C. elegans*, демонстрировали наличие двигательных дефектов, сопровождавшееся нарушением синаптической передачи и накоплением агрегатов белков, а также сокращением продолжительности жизни (Chen et al., 2011; Kumimoto et al., 2013; Watson et al., 2008).

D. rerio в качестве модельной системы используется относительно недавно, хотя уже стал популярным объектом ввиду простоты содержания, сочетающейся с более высокой сложностью анатомического устройства, свойственной

позвоночным (Patten et al., 2014). На полосатом Данио были получены модели БАС, с оверэкспрессией мутантных вариантов человеческих: *SOD1*, *TDP-43*, *FUS* и *C9ORF72*. Оверэкспрессия мутантной формы белка *SOD1*, например, приводила к аксональным дефектам, ассоциированным с локомоторным дефицитом, мышечной атрофией и параличом, которые коррелировали с возрастом (Lemmens et al., 2007; Sakowski et al., 2012). Другие модели, полученные на *D. rerio*, также демонстрировали двигательные нарушения, сопровождавшиеся накоплением нерастворимых агрегатов белков в нейронах, аналогично тому, как это происходит у людей (Bosco et al., 2010b; Voigt et al., 2010).

Несомненно, основными объектами, исследования которых внесли наибольший вклад в понимание механизмов патогенеза БАС, являются грызуны (*R. norvegicus*, *M. musculus*). Изучение трансгенных мышечных моделей, экспрессирующих мутантную форму белка *SOD1*, не только пролило свет на ключевые особенности *SOD1*-ассоциированной нейродегенерации, но и сформировало базовые представления о патологических механизмах, лежащих в основе БАС в целом (Bento-Abreu et al., 2010; Ferraiuolo et al., 2011) (См. «Патологические механизмы развития БАС»).

Годы исследований механизмов БАС и тестирования различных лекарственных соединений на животных моделях так и не привели к появлению эффективных способов замедления или остановки нейродегенерации, что, отчасти, говорит о неполной воспроизводимости особенностей функционирования нервной системы человека на животных моделях, и требует поиска новых подходов к изучению БАС. За последние годы была предпринята лишь одна попытка создания модели БАС на приматах (Uchida et al., 2012). В проведенном исследовании макаки-крабоеды показали развитие симптомов заболевания моторных нейронов, как фенотипически, так и морфологически, напоминающего клиническую картину БАС у людей. Тем не менее, ввиду высокой стоимости и трудоемкости процесса создания, а также этических ограничений, данная модель не получила широкого распространения. Работы, ведущиеся в области стволовых клеток, разработка новых методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), их направленной дифференцировки в различные типы клеток,

представили миру новую область исследований, которая потенциально может разрешить трудности, возникшие в процессе изучения БАС.

Моделирование нейродегенеративных заболеваний *in vitro* с использованием культур клеток уже стало рутинным методом, применяемым для изучения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и других. Данный подход имеет ряд преимуществ: генетический фон, свойственный человеку, физиологические уровни экспрессии мутантных генов (которых невозможно достичь в трансгенных моделях), возможность изучать спорадические случаи и масштабировать эти исследования для скрининга лекарственных средств. Таким образом, несмотря на обвинения в излишнем упрощении и неточности воспроизведения, клеточные модели все больше укрепляются в качестве основного метода для изучения патологии человека.

Плюрипотентные стволовые клетки человека – ценный ресурс для исследователя, поскольку с их помощью можно получать желаемый тип клеток, например моторные нейроны. И, таким образом, изучать *in vitro* молекулярные механизмы, лежащие в основе заболевания, на том типе клеток, который непосредственно подвержен дегенерации при БАС (Avior et al., 2016; Ye et al., 2018). Более того, *in vitro* клеточные модели позволяют исследовать ранние и пресимптоматические изменения, которые приводят к нейродегенерации. На сегодняшний день были получены ИПСК от пациентов с различными мутациями, включая *SOD1*, *TDP-43*, *VAPB* и *C9ORF72* (Bilican et al., 2012; Dafinca et al., 2016; Dimos et al., 2008; Mitne-Neto et al., 2011). Они успешно были дифференцированы в спинальные МН и различные типы глиальных клеток.

Некоторые ультраструктурные ключевые особенности БАС также воспроизводятся в МН, полученных из ИПСК: наличие белковых агрегатов в цитоплазме, формирование стресс-гранул и нарушение организации нейрофиламентов (Chen et al., 2014; Matus et al., 2014). Эти МН демонстрируют функциональный фенотип, специфичный для БАС: сниженная жизнеспособность клеток (Bilican et al., 2012), дефекты ядерно-цитоплазматического транспорта (Zhang et al., 2015) и измененная возбудимость (Kiskinis et al., 2014). Нейральные клетки, полученные из ИПСК, также используют для изучения неавтономных механизмов развития БАС (Ferraiuolo et al., 2016; Giorgio Di et al., 2007; Meyer et al.,

2014). Данный тип экспериментов представляет собой первый шаг к усложнению клеточных модельных систем, который необходим для изучения запутанных межклеточных взаимодействий в нервной системе человека. Протоколы для получения 3D нейральных органоидов уже были применены для изучения некоторых других заболеваний, но не БАС (Hartley, Brennand, 2017; Schwank et al., 2013), однако, подобные технологии могут быть использованы и для исследования дегенерации моторных нейронов.

Помимо биологического подхода к исследованию нейродегенерации существует и математический, который стал особенно популярен вследствие возрастающей скорости накопления данных, которые нуждаются в обработке. Базируясь на полученных знаниях, разрабатывая и анализируя модели «поведения» нативных и мутантных белков, клеточных взаимодействий, исследователь может строить предсказания относительно вероятных механизмов развития заболевания (Alemasov et al., 2017; Li et al., 2015; Shao et al., 2013). Тем не менее, полученные таким образом данные необходимо подтверждать экспериментально.

1.1.3.2 Терапевтические стратегии в лечении БАС

Хотя БАС является заболеванием моторных нейронов, у пациентов часто обнаруживаются симптомы не связанные с моторными расстройствами: когнитивные нарушения, экстрапирамидальные нарушения и метаболический синдром (Prasad et al., 2018). Стратегия лечения таких пациентов состоит из двух частей: лекарственная и нелекарственная поддержка витальных функций, призванная обеспечить удовлетворительный уровень качества жизни (паллиативная помощь); и модифицирующая терапия, цель которой – замедлить скорость прогрессии симптомов БАС. И, если качество паллиативной поддержки больных с БАС значительно улучшилось за последние годы, лекарственная модифицирующая терапия почти не изменилась за 25 лет (Petrov et al., 2017). Таким образом, качественная медицинская помощь, которая выражается в адекватном уходе, грамотном разрешении болевого синдрома и респираторной поддержке, делает больше для поддержания жизни человека, чем лекарственная терапия (Dorst et al., 2017).

На сегодняшний день существует только два лекарственных препарата, одобренных для лечения БАС: Рилузол и Эдаравон. Первый, произведенный в 1995

году, поначалу показал многообещающие результаты на трансгенных мышинных моделях, откладывая момент появления первых симптомов и незначительно увеличивая выживаемость (Gurney, 1997). Похожие результаты наблюдались и среди пациентов, проходивших лечение Рилузолем, однако, средняя продолжительность жизни испытуемых увеличивалась лишь на 2-3 месяца (Bensimon et al., 1994). Тем не менее, за четверть века не было обнаружено более эффективного препарата. Механизм действия Рилузона до конца неясен: первоначально предполагалось, что он модулирует глутаматэргическую передачу сигнала (Bensimon et al., 1994), но дальнейшие исследования показали, что вероятнее он влияет на ионные токи Na^+ и K^+ и высвобождение нейротрансмиттеров (Bellingham, 2011). Второе лекарственное средство – Эдаравон – было одобрено к использованию в мае 2017 года. Первоначально созданный для лечения ишемического инсульта, Эдаравон действует как антиоксидант, что, теоретически, должно улучшать состояние пациентов вследствие снижения уровня окислительного стресса (Watanabe et al., 1994). Хотя доклинические испытания на мышцах с симптомами, подобными БАС, показали наличие положительного эффекта от лечения Эдаравоном (Yoshino, Kimura, 2006), первые клинические испытания на человеке не выявили значимого улучшения состояния у пациентов (Abe et al., 2017). Тем не менее, последующее сокращение критериев включения в испытуемую группу позволило выявить пациентов, чувствительных к действию Эдаравона (Abe et al., 2017).

Основываясь на фактах, которые были открыты на животных моделях БАС, был разработан и протестирован ряд химических соединений, которые в теории должны были улучшить состояние больных: замедлить скорость прогрессии, или отложить наступление первых симптомов. Несмотря на то, что все они демонстрировали многообещающие результаты на доклинических стадиях исследований, большинство из них провалилось на различных фазах клинических испытаний, поскольку они не показали желаемого эффекта, или обладали тяжелыми побочными эффектами (Таблица 1).

Таблица 1. Некоторые текущие и завершившиеся испытания лекарственных средств для терапии БАС.

№ В базе данных	Лекарственное средство	Механизм	Текущее состояние	Фаза и причина отмены
NCT 02238626	Ибудиласт	Модулирование нейровоспаления	Закончены	Неэффективен
NCT 02118727	Мемантин	Гипервозбудимость	Продолжается	
NCT 03359538	Рапамицин	Гомеостаз белка	Закончены	Побочные эффекты
2008-006891-31 (Eudract)	Литий	Гомеостаз белка	Закончены	Неэффективен
NCT 02166944	Тамоксифен	Модулятор аутофагии	Неизвестно	
NCT 00706147	Аримокромол	Модулятор аутофагии	Закончены	Низковыраженный эффект

Помимо различных химических соединений, разрабатываются и иные подходы к терапии БАС. Например, различные варианты генной терапии: изменение кодирующей последовательности гена, нокаут или посттранскрипционный сайленсинг мутантного аллеля (Chiriboga et al., 2016; Foust et al., 2013; Miller et al., 2013; Raoul et al., 2005; Smith et al., 2006; Thomsen et al., 2014; Yokota et al., 2004). И, хотя только 10% случаев БАС имеют генетическую природу, данный подход также важен, поскольку способен устранить причину заболевания.

Хотя на сегодняшний день о патогенезе БАС известно гораздо больше, чем 25 лет назад, до сих пор пациентам доступны лишь два препарата для лекарственной терапии. Сложные взаимодействия между нейронами и окружающими их клетками, запутанные молекулярные механизмы и различный генетический фон влияют на развитие заболевания. За последние годы был разработан ряд модельных систем для исследования БАС и тестирования

лекарственных средств, тем не менее, все они признаны неполноценными, поскольку ни одна из них не воспроизводит фенотип БАС в полной мере. Несовершенство модельных систем считается одной из основных причин провалов клинических испытаний. Таким образом, создание новых модельных систем является первоначальной задачей для будущих исследователей. Более того, важно разрабатывать методы нефармакологической коррекции заболевания, такие как генная и клеточная терапия, поскольку они потенциально могут обеспечить полное излечение от БАС.

1.2 Пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как основа для исследования патологических состояний

История исследований плюрипотентных стволовых клеток насчитывает уже сорок лет: с 1981 года, когда впервые были выделены эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мышей (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998). С тех пор, стволовые клетки являются одним из объектов для исследований различных процессов, связанных с эмбриональным развитием и дифференцировкой. Особая уникальность культивируемых стволовых клеток заключается в свойствах самообновления и плюрипотентности – способности дифференцироваться в желаемый тип клеток. Однако, в связи с этическими проблемами, с которыми столкнулись ученые при получении эмбриональных стволовых клеток человека, получение новых линий ЭСК сейчас является редкостью.

В 2006 году была опубликована работа, в которой авторы описали получение плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов взрослой мыши, путем эктопической экспрессии четырех генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* (Takahashi, Yamanaka, 2006). Клетки, полученные таким способом, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Уже спустя год были получены ИПСК из соматических клеток человека (Yu et al., 2007). ИПСК обладают основными свойствами ЭСК: самообновление и широкий потенциал дифференцировки – что сделало данный объект особо ценным в руках исследователей.

Возможность получения ИПСК из соматических клеток человека открыла новый путь для изучения различных, чаще обусловленных генетической мутацией, патологических состояний. Сам больной может выступать в качестве донора соматических клеток для репрограммирования в ИПСК и направленной дифференцировки, например, в те клетки, которые гибнут при исследуемой патологии, чтобы понять, какие процессы нарушены. Данный подход становится особенно полезен при исследовании заболеваний, в основе которых лежит гибель специфических типов клеток нервной, сердечно-сосудистой, или эндокринной систем, которые, зачастую, невозможно забрать для анализа у живого человека.

С момента получения первых ИПСК человека, был разработан ряд моделей заболеваний на основе ИПСК, взятых у пациентов (Ghaffari et al., 2018; Wiethoff et al., 2015). Большинство из них – генетические патологии с моногенной природой, хотя имеются и модели спорадических мультифакторных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера (Israel et al., 2012). Важно отметить, что в большинстве случаев полученные из ИПСК специфические типы клеток воспроизводят патологический фенотип, характерный для заболевания, которое они моделируют, что лишний раз доказывает пригодность подобных модельных систем для исследований (Alves et al., 2015; Bursch et al., 2019; Chen et al., 2014).

Однако на пути получения пациент-специфичных моделей заболеваний всегда стоит ряд вопросов, от решения которых зависит конечное качество модельной системы. Получение пациент-специфичной модели заболевания можно разделить на несколько этапов.

1) *Получение клеточного материала пациента.* Фибробласты кожи, мононуклеарные клетки периферической крови, кератиноциты, стволовые клетки жировой ткани, эмбриональные фибробласты и другие клетки уже были успешно репрограммированы к плюрипотентному состоянию (Aasen et al., 2008; Huangfu et al., 2008; Sun et al., 2009; Warren et al., 2010). В настоящее время выбор типа клеток, из которых получают пациент-специфичные ИПСК, зависит от ряда факторов:

- Эффективность репрограммирования. Данный показатель выше для клеток эмбрионального происхождения и интенсивно делящихся клеток, однако, чаще всего донором соматических клеток служит взрослый человек. В таком случае, обычно используются фибробласты кожи, которые относительно просто получить

и нарастить для репрограммирования. Кроме этого, эффективность получения колоний ИПСК также зависит от способа репрограммирования (см. ниже), возраста пациента и условий культивирования соматических клеток *in vitro* после биопсии (Raab et al., 2014).

- Комфорт донора. Несмотря на тот факт, что некоторые типы соматических клеток, например, стволовые клетки жировой ткани, имеют более высокие показатели эффективности репрограммирования, использовать их для получения пациент-специфичных ИПСК относительно сложно, поскольку их забор требует специального оборудования, навыков медперсонала, а сама процедура приносит дискомфорт пациенту. Поэтому, в последнее время в качестве материала предпочитают использовать либо биоптаты кожи, либо клетки периферической крови, поскольку эти методы характеризуются наименьшей инвазивностью (Kishino et al., 2015). В последнем случае, материал можно получить в любом медицинском учреждении. Полученный в результате образец крови может быть использован для большого количества экспериментов по репрограммированию. Кроме того, у клеток периферической крови, в отличие от фибробластов, отсутствует способность к делению, что исключает возможность хромосомных перестроек в культуре до репрограммирования.

2) *Выбор способа репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию.* Репрограммирование осуществляется с помощью эктопической экспрессии основных факторов, необходимых для установления и поддержания плюрипотентности (Takahashi, Yamanaka, 2006). Чаще всего для обеспечения необходимого уровня эктопической экспрессии внутри клетки используют трансдукцию лентивирусными векторами, несущими интересующие гены. Такой способ отличается высокой эффективностью получения ИПСК, однако он менее предпочтителен ввиду частой случайной интеграции векторов в геном, что может непредсказуемо изменить свойства ИПСК и их дифференцированных производных. Кроме того, случайная интеграция вирусных векторов приводит к неконтролируемой экспрессии факторов поддержания плюрипотентности, в результате чего клетки приобретают высокий онкогенный потенциал, делающий невозможным дальнейшее их использование в клеточной заместительной терапии (Okita et al., 2007). Поэтому, в последнее время предпочтительны способы

репрограммирования с помощью неинтегрирующихся в геном вирусных векторов на основе аденовирусов, вируса Сендай, плазмидных векторов или коктейля рекомбинантных белков (Rao, Malik, 2012; Schlaeger et al., 2015).

3) *Всесторонняя характеристика полученных линий ИПСК.* Полученные линии ИПСК требуют проведения обязательных тестов для подтверждения их плюрипотентного статуса: способности к самообновлению и дифференцировке в производные экто-, мезо- и энтодермы. На данном этапе посредством выявления экспрессии генов-маркеров плюрипотентных клеток и проведения спонтанной дифференцировки доказываем, что полученные ИПСК являются плюрипотентными и пригодны для дальнейших экспериментов, включающих в себя направленную дифференцировку в релевантный тип клеток (Медведев и др. 2014).

4) *Направленная дифференцировка ИПСК в релевантный тип клеток.* Релевантный тип клеток – тот тип, который интересен исследователю для изучения аспектов того или иного заболевания: моторные нейроны для бокового амиотрофического склероза, кардиомиоциты для наследственной кардиомиопатии, клетки печени для болезни Вильсона-Коновалова и пр. В данном аспекте важным является выбор протокола дифференцировки, который обеспечит наибольший выход целевого типа клеток для исследований (Du et al., 2015). Тут же можно применить различные подходы для улучшения модельной системы и придания ей большей сложности и реалистичности для максимально точного воспроизведения патофизиологических особенностей заболевания. К примеру, современные протоколы дифференцировки в различные типы нейральных производных, предусматривают создание сложных систем, состоящих из нескольких типов клеток, что обеспечивает более точное воспроизведение клеточных взаимодействий, как это имеет место в нервной ткани человека (Johnson et al., 2007; Jones et al., 2012). Кроме того, развитие технологий создания искусственных 3D скаффолдов позволяет выстраивать эти системы в объеме, повторяя архитектуру тканей (Knight, Przyborski, 2015; Terrasso et al., 2017).

5) *Изучение соответствия полученной клеточной модели заболеванию человека, от которого клетки были получены.* На данном этапе необходимо показать, что полученные методом направленной дифференцировки клетки

действительно воспроизводят патологический фенотип. Для этого должен быть проведен сравнительный анализ исследуемых клеток с клетками условно здорового контроля. Различия могут быть выявлены на структурном уровне: накопление агрегатов белков, изменение формы и числа органелл, изменение формы (сниженная степень ветвления отростков нейронов) и размера клеток; или на функциональном уровне: изменение потенциала действия возбудимых клеток, сниженная способность к образованию связей или продукции веществ (Alves et al., 2015; Aulas, Velde Vande, 2015; Bosco et al., 2010b; Fallini et al., 2012). Зачастую, вследствие неонатального, незрелого фенотипа клеток, полученных из ИПСК, и большого количества трофических факторов в культуральной среде, значимых отличий может и не быть. В таком случае необходимо прибегать к воздействию стресс-факторов: свет, температура, закисление среды – чтобы выявить меньшую устойчивость больных клеток по сравнению со здоровыми (Richardson et al., 2013).

б) *Поиск путей коррекции патологического фенотипа.* Данный этап предполагает использование полученной модельной системы для тестирования различных методов лечения заболевания. В первую очередь, клеточная модель может быть использована для скрининга химических соединений с целью обнаружения того, который будет способен увеличить выживаемость клеток; ослабить проявление или устранить патологические явления структурного и функционального характера (Mizuno et al., 2004; Noto et al., 2016; Rudzinski et al., 2016). Кроме того, она также может быть использована в качестве платформы для тестирования методов генной терапии (Ousterout et al., 2015; Park et al., 2014).

С использованием представленного подхода было создано большое количество различных моделей для изучения заболеваний сердечно-сосудистой системы, нервной системы, опорно-двигательного аппарата, крови, печени, почек и других (Таблица 2).

Таблица 2. Модели болезней человека, полученные на основе дифференцированных производных ИПСК.

Заболевание	Ген	Тип изменения	Ссылка
Поликистозная болезнь почек	<i>PKD1, PRD2</i>	Инсерции/делеции	(Freedman et al., 2015)
Врожденный дискератоз	<i>DKC1</i>	Гомологичная рекомбинация	(Woo et al., 2016)
Расстройства аутистического спектра	<i>CHD8</i>	Делеция	(Wang P. et al., 2015)
Синдром ICF	<i>DNMT3B</i>	Делеция	(Horii et al., 2013)
Болезнь Альцгеймера	<i>APP, PSEN1</i>	Гомологичная рекомбинация	(Paquet et al., 2016)
Муковисцидоз	<i>CTFR</i>	Гомологичная рекомбинация	(Schwank et al., 2013)
Миодистрофия Дюшенна	<i>DMD</i>	Делеция	(Li H. et al., 2015)
Анемия Фанкони	<i>FANCC</i>	Гомологичная рекомбинация	(Osborn et al., 2015)
Буллезный эпидермолиз	<i>KRT14</i>	Гомологичная рекомбинация	(Kocher et al., 2017)

1.3 Использование технологии CRISPR/Cas9 для моделирования патологических состояний и генной терапии

Направленное изменение последовательностей генов представляется наиболее желанной задачей для многих исследователей, в том числе работающих в области биомедицины. Потенциально, оно может помочь как в изучении, так и в лечении ныне неизлечимых заболеваний. Технологии геномного редактирования развиваются стремительно и в настоящий момент являются частью рутинной практики исследователей. CRISPR/Cas9 представляет собой один из наиболее используемых инструментов для редактирования генов животных, растений и клеточных культур.

CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) – это система адаптивного иммунитета бактерий и архей против чужеродных генетических элементов, таких как вирусы и плазмиды (Horvath, Barrangou, 2010). Основными активными компонентами системы являются белки Cas. Один из них, Cas9, способен производить двуниевые разрывы в молекулах ДНК, действуя совместно с cr-РНК (crispr-РНК) и tracr-РНК (трансактивационная РНК), которые направляют белок Cas9 к определенному сайту (протоспейсеру), комплементарному последовательности (спейсеру) crРНК. В природе системы CRISPR/Cas обеспечивают устойчивость бактерий к фагам за счет специфического гидролиза ДНК патогена, специфичность которого определяется наличием комплементарного взаимодействия crРНК и различных последовательностей в геноме патогена. Эта особенность легла в основу CRISPR/Cas9 – метода для направленного редактирования генов в лаборатории.

Идея редактирования ДНК при помощи CRISPR/Cas9 заключается во внесении двуниевых разрывов в интересующей последовательности нуклеотидов. Узнавание сайта гидролиза происходит также как и в естественных условиях, с помощью молекулы РНК, в составе которой имеется последовательность спейсера (как в crРНК), и которая называется направляющей РНК (нРНК). Получившийся в результате разрыв может быть устранен при помощи одного из двух механизмов репарации: негомологичного сшивания концов (Non-homology end joining) или гомологичной рекомбинации (ГР). В подавляющем большинстве случаев в клетках млекопитающих репарация происходит при помощи первого механизма и часто ассоциирована с возникновением мутаций в сайте разрыва. Поэтому данный способ можно использовать для создания нокаута целевого гена (Ousterout et al., 2015; Perez et al., 2008).

Второй механизм несколько сложнее. Во-первых, потому что ГР сама по себе происходит значительно реже. Во-вторых, необходимы дополнительные молекулы – матрицы, которые будут служить образцом для восстановления поврежденной молекулы ДНК. В качестве такой матрицы чаще всего используют два типа конструкций: одноцепочечные и двуцепочечные олигонуклеотиды, или плазмидные векторы (Song, Stieger, 2017). С помощью ГР и донорных молекул в

целевом локусе можно произвести замену для внесения мутации или наоборот, исправить уже имеющуюся (Savić, Schwank, 2016).

Эффективность системы CRISPR/Cas9 для редактирования целевых генов была неоднократно показана на самых разных модельных организмах и культурах клеток (Hwang et al., 2013; Mali et al., 2013; Schwank et al., 2013; Wang et al., 2013). Особый интерес, представляет редактирование генов культивируемых клеток при помощи CRISPR/Cas9 для создания модельных систем и исправления мутаций, вызывающих заболевания у людей.

На сегодняшний день существует множество заболеваний, которые не поддаются лечению стандартными методами, применимыми в медицине: лекарственными, радиологическими или хирургическими. Чаще всего, данные заболевания обладают сложным патогенезом, все элементы которого невозможно обнаружить и связать в единое целое, или первопричину невозможно устранить, как это бывает с генетическими патологиями, или присутствуют сразу оба фактора. Изучение таких заболеваний зачастую бывает затруднительно на традиционных животных моделях или постмортальных образцах тканей, поскольку они не всегда повторяют полностью те процессы, которые имеют место в пораженных заболеванием человеческих клетках. Использование модельных систем, базирующихся на клеточных линиях, потенциально может преодолеть данную проблему. Применяя метод редактирования генома, можно вносить мутации в последовательность интересующего гена, чтобы затем исследовать ее патологический эффект (Freedman et al., 2015; Wang et al., 2015). Важным преимуществом данного подхода является получение так называемых изогенных пар клеточных линий, где «больная» и «здоровая» различаются только по внесенной мутации, что устраняет потенциальное влияние генетического фона на проявление патологического признака (Ananiev et al., 2011; Ling et al., 2010).

Немаловажно и то, что с помощью направленного внесения мутации в геном можно получать модели редких заболеваний, носителей которых не всегда можно найти среди пациентов клиник. Так, в 2013 году группа исследователей опубликовала работу по созданию модели ICF (Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies) синдрома – экстремально редкой патологии, описанной только у 50 человек по всему миру. Развитие заболевания в данном случае связано

с мутацией гена *DNMT3B*, кодирующего ДНК-метилтрансферазу 3В. Мутация *DNMT3B* приводит к гипометилированию повторов сателлита 2 и деконденсации прицентромерных районов хромосом, что является причиной нестабильности данного района. В описанной работе авторы провели нокаут гена *DNMT3B*, что выразилось в снижении уровня метилирования повторов сателлита 2, показывая, что полученная клеточная модель воспроизводит особенности патологического фенотипа (Horii et al., 2013).

Интересный подход для изучения вклада отдельных генов в развитие сложных синдромов показали Вонг с соавторами (Wang et al., 2015). В описываемой работе исследователи нокаутировали с помощью CRISPR/Cas9 системы ген *CHD8*, ответственный за ремоделирование хроматина. Мутации в данном гене ранее были классифицированы как факторы риска для расстройств аутистического спектра. Учитывая факт, что в данную группу включено более 1000 генов, установить конкретное влияние каждого на развитие психического расстройства сложно (Rubeis De, Vuxbaum, 2015). Авторам удалось показать, что нокаут *CHD8* приводит к изменению транскрипции ряда генов, ответственных за нейральную дифференцировку, развитие мышечной системы и межклеточного матрикса, а также генов ассоциированных с развитием шизофрении (Wang et al., 2015). Таким образом, была установлена роль конкретного гена в патогенезе расстройства.

Другой вариант использования редактирования генов представил Фридман с соавторами (Freedman et al., 2015). В описываемой работе в здоровых ИПСК были нокаутированы гены *PKD1* и *PKD2*, мутации в которых приводят к развитию аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек. Затем, авторы провели направленную дифференцировку полученных ИПСК с получением почечных органоидов. В результате, они показали образование кист в органоидах, полученных из мутантных клеток, которых не наблюдалось в контроле (Freedman et al., 2015). Используя такой метод, можно комбинировать в органоиде клетки с разным генетическим фоном, показывая, какой вклад вносят определенные мутации в различных типах клеток, образующих орган.

В последнее время все чаще говорят об использовании технологии редактирования генов для лечения заболеваний. И хотя необходимо решить еще большое количество вопросов, связанных с генной терапией людей, уже

существует ряд стратегий, которые могут быть использованы и которые уже показали определенную степень эффективности на *in vitro* и животных моделях.

Одна стратегия предполагает внедрение нормальной копии гена в безопасный локус в геноме, откуда трансген мог бы экспрессироваться и производить нормальный продукт взамен мутантного гена. Такой подход может быть проще, однако он не исключает возможности случайной интеграции трансгена в другие места в геноме, и, кроме того, подобная встройка не застрахована от гетерохроматинизации и сайленсинга.

Если мутация приводит к накоплению токсического продукта или изменению функции кодируемого белка, целесообразно проводить нокаут гена. Хотя у данного метода существует условие: нокаутируемый ген не должен быть жизненно важным и единственным выполняющим какую-либо функцию. Если удаление гена невозможно, необходимо производить коррекцию его последовательности. Так, группа авторов, используя CRISPR/Cas9, удалила часть гена дистрофина, частично восстановив его функцию в пациент-специфичных миобластах (Ousterout et al., 2015). В других работах авторы прибегали к коррекции гена посредством гомологичной рекомбинации с матрицей, несущей исправленную последовательность (Chang et al., 2015; Firth et al., 2015; Osborn et al., 2015).

На сегодняшний день достаточно рано говорить о генной терапии наследственных заболеваний, поскольку не решены проблемы доставки компонентов систем для редактирования в клетки взрослого человека, нет четкой уверенности в отсутствии нецелевых эффектов при использовании CRISPR/Cas9. Однако, скачок в развитии данной сферы, совершенный за последние пять лет, оставляет надежду на то, что сообщество исследователей движется в правильном направлении и редактирование мутантных генов будет возможно в отдаленном будущем.

1.4 Генетически-кодируемые биосенсоры

Одна из основных задач клеточной биологии – исследование того, как различные составляющие клетки – молекулы, или органеллы – взаимодействуют друг с другом в постоянно изменяющихся условиях. Вплоть до конца XX века это было возможно только посредством использования органических красителей,

специфически связывающих определенные молекулы, или структуры клетки (Tsien, 1989; Walia et al., 2018). Основным недостатком таких красителей была высокая степень влияния на функционирование клетки за счет связывания и выключения целевых молекул из процессов, в которых они задействованы, что могло приводить к получению некорректных данных. Однако, развитие технологии генетически-кодируемых биосенсоров позволило преодолеть эти ограничения (Miyawaki et al., 1997).

Генетически-кодируемые биосенсоры, исходя из названия, представляют собой белки, чья последовательность закодирована в виде ДНК: молекулы биосенсора образуются уже внутри клетки с использованием клеточных механизмов транскрипции и трансляции. В таком виде, биосенсоры относительно просто конструировать, используя стандартные молекулярно-биологические подходы. Например, присоединять специфические сигнальные последовательности, необходимые для закрепления биосенсора в определенном компартменте клетки (ядре, митохондриях) (Panieri et al., 2017). Кроме того, их использование позволяет исследовать целевые процессы, не нарушая пространственные и временные характеристики взаимодействия клеточных компонентов. Среди основных свойств биосенсоров также выделяют высокую селективность в отношении целевых событий, молекул или процессов; высокое соотношение уровней сигнал/шум и возможность количественной оценки сигнала (не для всех) (Okumoto et al., 2012; Sadanandom, Napier, 2010).

На сегодняшний день существует большое число разнообразных по мишеням, строению и принципам работы биосенсоров (<https://biosensordb.ucsd.edu/biosensorDB/bsListClass.php>). Однако, в общем, все они состоят из двух доменов: чувствительного и репортерного.

Чувствительный домен ответствен за распознавание специфических сигналов: молекул, ферментативной активности или белковых взаимодействий. Он может состоять из одной полипептидной цепи, или из двух и более белковых фрагментов. Например, в одном из первых разработанных генетически-кодируемых биосенсоров, измеряющих динамику ионов Ca^{2+} (Cameleon), в качестве чувствительного домена используется кальмодулин, связанный с киназой легких цепей миозина (M13), и изменения конформации чувствительного домена

данного биосенсора происходят в ответ на связывание ионов Ca^{2+} с кальмодулином (Miyawaki et al., 1997) (Рисунок 2а). В других сенсорах, чувствительный домен может подвергаться модификации с помощью ферментов, например, киназ (Harvey et al., 2008; Zhang et al., 2001). Кроме того, чувствительный домен не всегда может представлять собой растворимый белок, что имеет место в мембранно-связанных чувствительных к напряжению (Voltage sensitive) биосенсорах для исследования мембранного потенциала (St-Pierre et al., 2015).

Основное требование к репортерному домену генетически-кодируемого биосенсора – наличие качественного сигнала. Это выражается, как в высокой интенсивности, так и в широком динамическом диапазоне, что необходимо для детекции небольших изменений. В подавляющем большинстве случаев, репортерный домен состоит из одного или двух флуоресцентных белков (ФБ), хотя существуют и исключения (Jiang et al., 2007; Saito et al., 2012). В зависимости от структуры репортерного домена, биосенсоры на основе ФБ делят на 5 групп (Рисунок 2а-е):

- 1) С внутримолекулярным FRET (Förster resonance energy transfer)-взаимодействием;
- 2) С межмолекулярным FRET-взаимодействием;
- 3) С бимолекулярной флуоресцентной комплементацией;
- 4) Одиночный ФБ с наружным чувствительным доменом;
- 5) Одиночный ФБ с внутренним чувствительным доменом

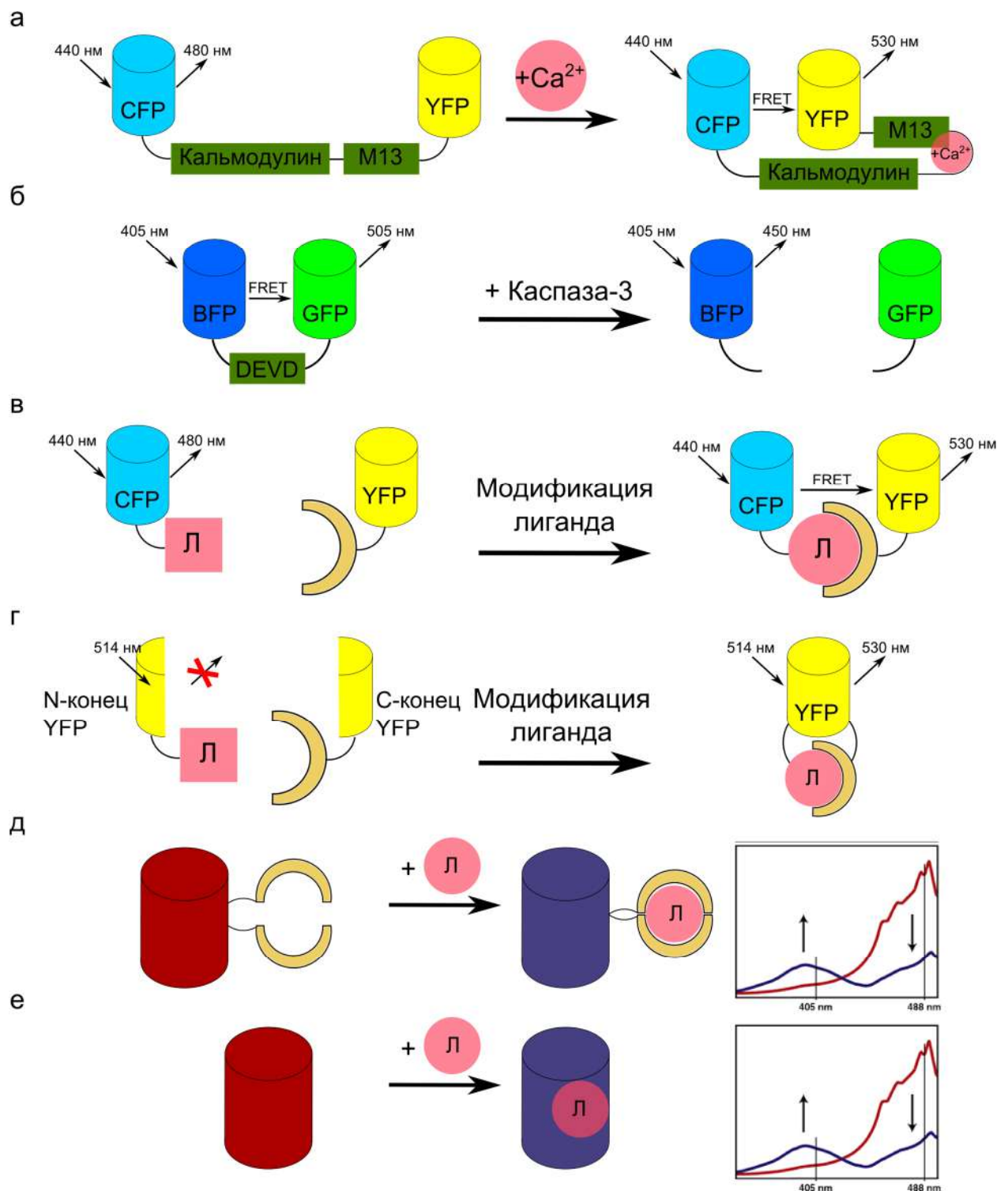


Рисунок 2. Типы флуоресцентных генетически-кодируемых биосенсоров. а – Генетически-кодируемый биосенсор ионов Ca^{2+} с внутримолекулярным FRET-взаимодействием (Cameleon). Показано, как взаимодействие с ионами Ca^{2+} меняет конформацию чувствительного домена, состоящего из кальмодулина и киназы легких цепей миозина (M13), и сближает два флуоресцентных белка, между которыми возникает FRET-взаимодействие. б – Генетически-кодируемый биосенсор Каспазы-3 с внутримолекулярным FRET-взаимодействием. Показано, как разрезание пептидного линкера, содержащего сайт узнавания для Каспазы-3 (DEVD), приводит к разобщению флуоресцентных белков и прекращению FRET-взаимодействия. в - Генетически-кодируемый биосенсор с межмолекулярным

FRET-взаимодействием. Показано, как модификация лиганда, соединенного линкером с одним из флуоресцентных белков, делает возможным связывание с чувствительным доменом биосенсора, соединенным с другим флуоресцентным белком, и возникновение FRET-взаимодействия. г - Генетически-кодируемый биосенсор с бимолекулярной флуоресцентной комплементацией. Показано, как две разобщенные половины флуоресцентного белка образуют единый функциональный белок вследствие образования связи между чувствительным доменом и модифицированным лигандом. д и е - Генетически-кодируемый биосенсор на основе одиночного флуоресцентного белка с наружным (д) и внутренним (е) чувствительным доменом. Показано, как связывание лиганда меняет спектральные характеристики флуоресцентного белка. CFP – Cyan fluorescent protein, голубой флуоресцентный белок; YFP – yellow fluorescent protein, желтый флуоресцентный белок; BFP – blue fluorescent protein, синий флуоресцентный белок; GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок; Л – лиганд.

FRET – феномен нерадиационного переноса энергии, наблюдаемый между двумя ФБ (от донора с более низкой энергией возбуждения, к акцептору с более высокой) – оказался крайне полезен при конструировании биосенсоров. Канонически, биосенсоры первой группы состоят из двух ФБ, соединенных полипептидной цепью, представляющей собой чувствительный домен. Конформационные изменения чувствительного домена влияют на расстояние между ФБ и изменяют эффективность переноса энергии.

Эти сенсоры могут быть использованы для исследования протеолитической активности белков: в таком случае, разрезание полипептидной связи приводит к разобщению FRET-пары, соответствующему снижению эффективности переноса энергии и увеличению интенсивности сигнала донорного ФБ (Sabariegos et al., 2009; Tsai et al., 2009) (Рисунок 2б). Такой подход, например, был применен для создания биосенсоров апоптоза. Их работа основана на способности эффекторных белков апоптоза – каспаз – расщеплять субстраты, содержащие определенные последовательности аминокислот (например, D-E-V-D для каспазы-3). Первый такой биосенсор был разработан для каспазы-3 (Xu et al., 1998). Он состоит из двух ФБ, BFP (blue fluorescent protein, синий ФБ) и GFP (green fluorescent protein, зеленый ФБ), связанных линкером, содержащим последовательность для гидролиза. При индукции апоптоза, биосенсор подвергается гидролизу, что приводит к разобщению ФБ и прекращению FRET-взаимодействия (Tuas et al.,

2000). Таким образом, становится возможной не только детекция апоптоза, но и измерение активности каспазы-3 в динамике.

Позднее были разработаны сенсоры и для других каспаз, что позволило отслеживать разные стадии апоптоза (Takemoto et al., 2003). В настоящий момент данные биосенсоры активно применяются для исследования как самого процесса программируемой клеточной гибели, так и для исследования потенциальных триггеров апоптоза, таких как амилоид при болезни Альцгеймера и диабете 2 типа, или компоненты химиотерапии онкологических заболеваний (Anand et al., 2015; Paulsson et al., 2008).

Сенсоры этого же типа могут работать и наоборот, когда связывание биосенсора с целевой молекулой приводит к сближению ФБ и возникновению взаимодействия между ними (Рисунок 2а). Они активно применяются для исследования небольших молекул, таких как сахара (Ha et al., 2007; Takanaga et al., 2008), аминокислоты (Hires et al., 2008), и ионы (Dittmer et al., 2009; Lindenburg et al., 2013; Wegner et al., 2010), в том числе упомянутый ранее Ca^{2+} (Heim, Griesbeck, 2004; Miyawaki et al., 1997).

Биосенсоры второй группы структурно отличаются от первой только тем, что их части физически не связаны: чувствительный домен соединен с одним ФБ, а целевая молекула (лиганд) – со вторым ФБ (Рисунок 2в). Обычно, модификация лиганда приводит к возникновению взаимодействия с чувствительным доменом. Таким образом, связывание лиганда с чувствительным доменом физически сближает ФБ и приводит к возникновению FRET-взаимодействия. Подобные биосенсоры с успехом применяют для исследования белок-белковых взаимодействий, олигомеризации семейства G-белков и активации рецепторов (Marcaggi et al., 2009; Rives et al., 2009). Основной недостаток такого сенсора состоит в том, что две части могут быть представлены в разных количествах ввиду разного уровня экспрессии, что затрудняет интерпретацию результатов и количественную оценку исследуемых явлений (Moeuwaert, Dedecker, 2020).

Работа биосенсоров третьей группы основана на способности некоторых ФБ образовывать функциональный белок из двух отдельно экспрессирующихся частей - бимолекулярной флуоресцентной комплементации. В данном типе сенсора, чувствительный домен соединен с одной из половин, а лиганд – со второй, что

роднит их с сенсорами второй группы (Рисунок 2г). Биосенсоры третьей группы также используют для визуализации различных белок-белковых взаимодействий, например, белков группы polycomb с гистонами (Vincenz, Kerppola, 2008), или субъединиц вирусной полимеразы (Nemerka et al., 2009). В отличие от биосенсоров с межмолекулярным FRET-взаимодействием, сенсоры третьей группы отличаются низким уровнем шума, поскольку части ФБ не способны производить флуоресцентный сигнал самостоятельно, что должно повышать точность измерений. Однако, вместе с тем, они требуют времени для образования функционального ФБ, что делает невозможным их использование для исследования динамических процессов (Miller et al., 2016).

Четвертая и пятая группы биосенсоров отличаются от предыдущих тем, что в их основе лежит единый неразделенный ФБ. В случае сенсоров четвертой группы специфическое узнавание обеспечивает чувствительный домен, физически соединенный с ФБ (Рисунок 2д). Таким образом, например, были сконструированы биосенсоры АТФ (Berg et al., 2009), а также Ca^{2+} (Souslova et al., 2007), Zn^{2+} (Mizuno et al., 2007) и цГМФ (Nausch et al., 2008). Характерным для биосенсоров пятой группы является фактическое отсутствие чувствительного домена, а точнее, двойная роль ФБ: в качестве как чувствительного, так и репортерного домена (Рисунок 2е). В таких сенсорах, сигнал напрямую зависит от химического состояния активного центра ФБ (окисленного, или восстановленного), и отражает состояние окислительно-восстановительного баланса в клетке (см. «Биосенсоры окислительно-восстановительных реакций»).

Ранние исследования с использованием биосенсоров четвертой и пятой групп часто опирались на обратимые изменения интенсивности сигнала ФБ, возникающие в ответ на определенные события. Данный подход, однако, имел ряд существенных недостатков, таких, как сложность калибровки и значительные отличия в уровне сигнала между образцами (Johnson et al., 2009). Преодолеть данные ограничения помогает использование ФБ, чьи свойства изменяются в количественной манере, в зависимости от выраженности события, или концентрации лиганда, для которых эти биосенсоры были разработаны, то есть, ратиометрически. Эти биосенсоры оказались особенно полезны при исследовании таких явлений, как внутриклеточный pH (Miesenböck et al., 1998), H_2O_2 (Gutscher et

al., 2009), глутатиона (Gutscher et al., 2008), АТФ (Yaginuma et al., 2014) и электрического напряжения на мембранах (Abdelfattah et al., 2016) и наиболее активно применяются для исследования окислительно-восстановительных реакций (см. «Биосенсоры окислительно-восстановительных реакций»).

Генетически-кодируемые флуоресцентные биосенсоры представляют собой перспективный инструмент для исследования различных процессов. Будучи встроенными в геном, они позволяют осуществлять длительное измерение интересующих показателей в состоянии покоя, или в ответ на определенные стимулы. В данном контексте, становится возможным исследование во времени процессов, связанных с гибелью специфических типов клеток при дегенеративных заболеваниях, а также влияние старения на функционирование клеток (Esposito et al., 2017; Parmar, Schroder, 2012). Стремительно развивающиеся методы детекции и разработка биосенсоров на основе флуоресцентных белков, испускающих сигналы в красном и инфракрасном диапазоне, позволяют проводить исследования на уровне многоклеточных структур-органовидов и даже целых организмов (Yu et al., 2014; Yu et al., 2015). Совместно с поиском новых мишеней, такие биосенсоры потенциально могут помочь изучать патологические процессы в условиях максимально приближенных к естественным, а также смотреть, как те или иные химические вещества способны влиять на них.

1.4.1 Биосенсоры окислительно-восстановительных реакций

Окислительно-восстановительные (ОВ) реакции являются неотъемлемой частью жизнедеятельности клетки. В норме АФК – побочный продукт реакций окисления – быстро обезвреживаются антиокислительными системами клетки (Рисунок 3).

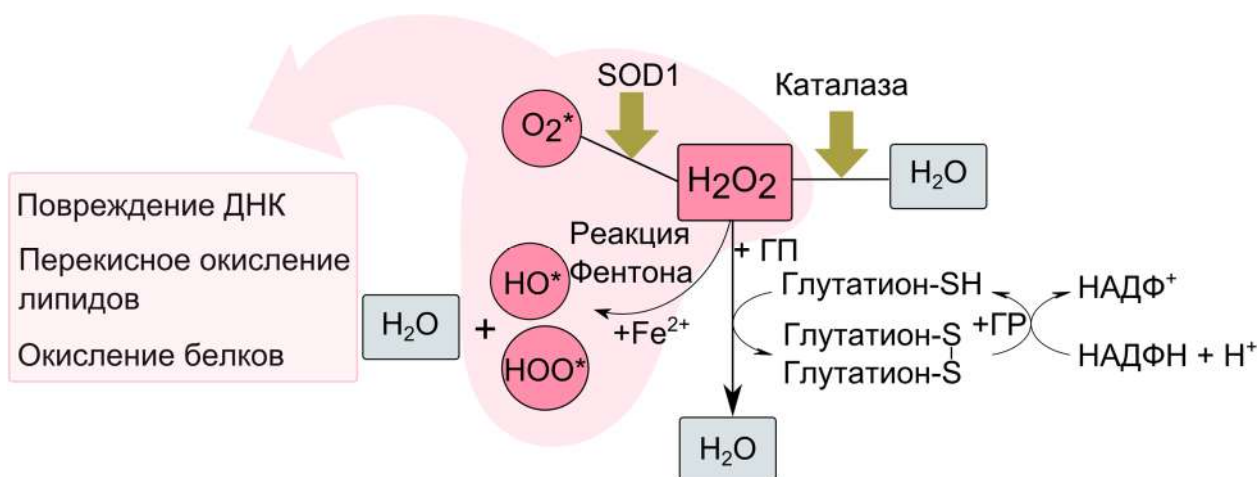


Рисунок 3. Процесс утилизации активных форм кислорода в клетке. Показана схема превращений кислородных радикалов O_2^* в H_2O_2 с помощью супероксиддисмутазы 1 (SOD1) и три возможных пути превращения H_2O_2 : образование воды в реакции с каталазой, образование воды за счет окисления глутатиона, образование воды и кислородных радикалов HO^* и HOO^* в реакции Фентона. Для глутатиона показана реакция восстановления посредством глутатион-редуктазы за счет окисления НАДФН. ГП – глутатион-пероксидаза, ГР – глутатион-редуктаза.

Однако в случае большого количества АФК, или некорректной работы какой-либо системы утилизации, концентрация АФК в клетке, или ее отдельных компартментах возрастает, что приводит к изменению химического состояния среды и дисфункции клетки. Именно нарушение ОВ баланса, или окислительный стресс, называют в качестве одной из причин гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, например, БАС (Chinta, Andersen, 2008; Esposito et al., 2017). Тем не менее, до сих пор не ясно, является ли в данном случае окислительный стресс первопричиной или следствием нарушений других клеточных процессов.

В настоящее время существует ряд генетически-кодируемых биосенсоров, чувствительных к изменению концентрации основных участников ОВ реакций: H_2O_2 , глутатион (восстановленная и окисленная форма), НАД-Н (Lukyanov, Belousov, 2014). Работа некоторых из этих сенсоров основана на обратимом окислении аминокислотных остатков цистеина, находящихся в активном центре хромофора, что приводит к изменению его флуоресцентных свойств (Рисунок 4а).

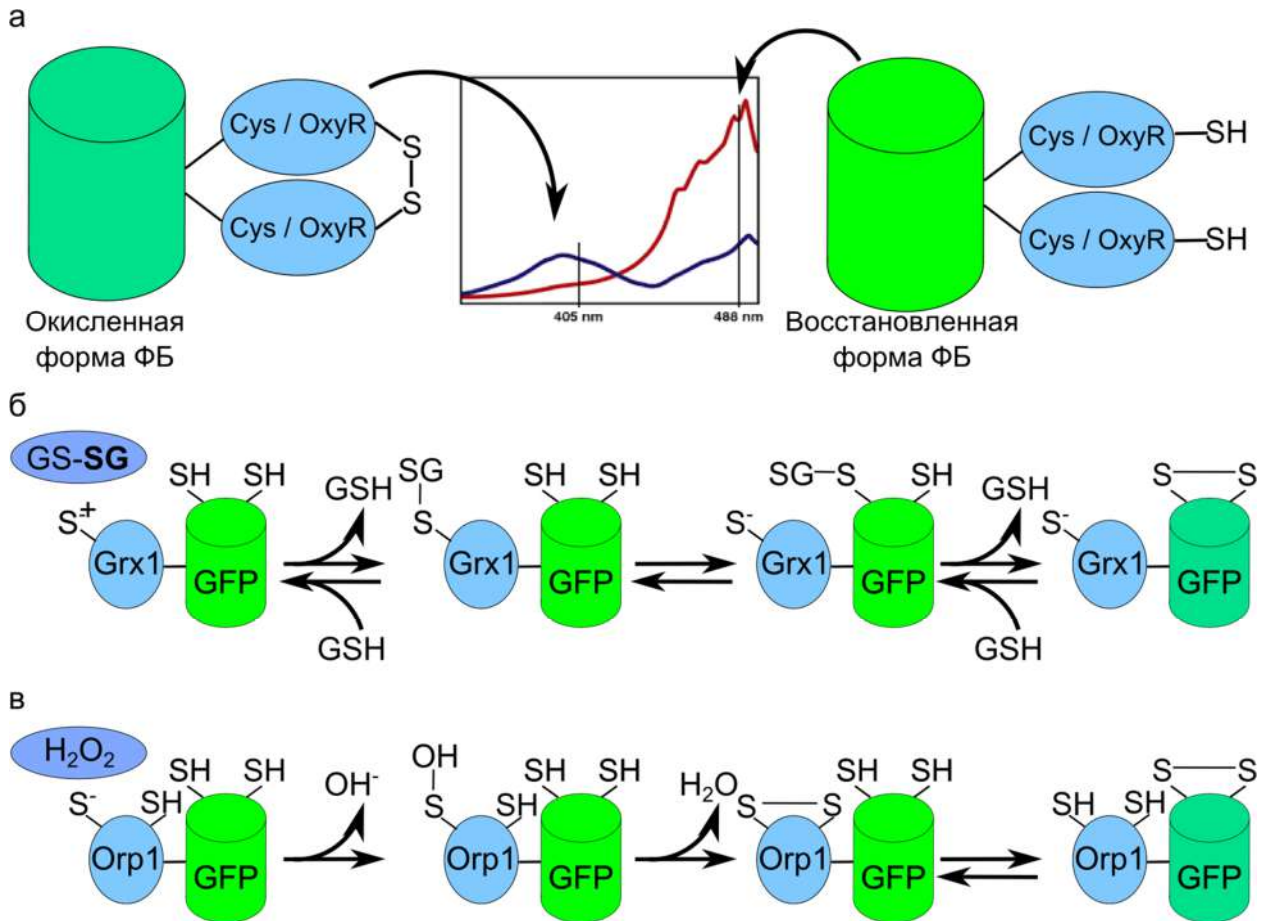


Рисунок 4. Схематичное изображение принципа работы радиометрических биосенсоров. а – Схема строения биосенсора HupReg в зависимости от его окисленного/восстановленного состояния. При взаимодействии с H_2O_2 происходит образование дисульфидной связи в OxyR. Возникающие конформационные изменения передаются на флуоресцентный белок и приводят к изменению максимума его возбуждения. б – Принцип работы биосенсора соотношения GSH/GSSG. При взаимодействии с окисленной формой глутатиона (GS-SG) происходит реакция тиольного обмена между ним и глутаредоксином (Grx1), соединенным с зеленым флуоресцентным белком (GFP), в результате которой глутатион восстанавливается с образованием дисульфидной связи в GFP. в - Принцип работы биосенсора H_2O_2 . В результате реакции с H_2O_2 происходит образование дисульфидной связи в тиолпероксидазе Orp1, которая перебрасывается на GFP с восстановлением Orp1.

Один из наиболее известных биосенсоров – HupReg – позволяет исследовать роль перекиси водорода в различных клеточных процессах. В его основе лежит желтый ФБ (YFP, yellow fluorescent protein), который соединен с регуляторным доменом чувствительного к окислению бактериального транскрипционного фактора OxyR (Рисунок 4а). Окисление цистеиновых остатков регуляторного домена OxyR в присутствии H_2O_2 приводит к образованию дисульфидной связи. Возникающие изменения конформации передаются на связанный с ним ФБ и

меняют его спектральные характеристики. Разные *NuPer* сенсоры различаются по динамическому диапазону и чувствительности к pH и позволяют измерять относительные изменения в концентрации H_2O_2 в клетке (Билан и др. 2015).

Другая группа *OB*-сенсоров работает на основе *OB*-чувствительного GFP (*roGFP*), чьи флуоресцентные свойства зависят от состояния ключевых остатков цистеина в собственном функциональном центре. Атомы серы этих остатков ведут себя аналогично цистеинам в глутатионе: существуют в виде двух тиольных остатков (восстановленная форма *roGFP*), или формируют дисульфидную связь (окисленная форма *roGFP*). Как и в случае с биосенсоров *NuPer*, окисленная и восстановленная формы *roGFP* имеют разные спектральные характеристики. Максимум возбуждения для восстановленной формы *roGFP* – 400 нм, восстановленной – 490 нм. Таким образом, возбуждая белок лазерами с длинами волн 405 нм и 488 нм (UV-диодный и аргоновый, соответственно), можно получить представление о соотношении окисленной и восстановленной форм *roGFP* в клетке и, следовательно, ее состоянии (Schwarzländer et al., 2016). Изменения в соотношении окисленной и восстановленной формы *roGFP* могут отражать соотношение восстановленного и окисленного глутитиона за счет реакции тиол-дисульфидного обмена между *roGFP* и глутатионом, которая, однако, лимитирована доступностью глутаредоксина. Следовательно, сенсор, состоящий из одного *roGFP* может и не отражать реальное соотношение GSH/GSSG, если глутаредоксина недостаточно. Данная проблема была решена путем получения биосенсора, в котором *roGFP* связан пептидной связью с глутаредоксином (*Grx1-roGFP*) (Gutscher et al., 2008), что позволило избежать неточностей в измерении, связанных с различной доступностью глутаредоксина в разных клетках и компартментах клетки (Рисунок 4б).

Похожим способом был сконструирован биосенсор для измерения H_2O_2 . Принцип его работы базируется на основе естественной реакции тиолпероксидаз с H_2O_2 , в результате которой перекись водорода восстанавливается до воды, а два тиольных остатка образуют дисульфидную связь. В биосенсоре, *roGFP* соединен с тиолпероксидазой дрожжей *Opr1*: реакция такого химерного белка с перекисью приводит вначале к окислению *Opr1* с образованием дисульфидной связи, которая затем восстанавливается, окисляя два остатка серы в активном центре *roGFP*

(Рисунок 4в). Такая реакция является необратимой в физиологических условиях, тем не менее, биосенсор способен к восстановлению *in vivo* за счет, вероятно, глутаредоксина, что позволяет проводить динамические измерения.

1.5 Заключение

Нейродегенерация в общем и боковой амиотрофический склероз в частности характеризуются комплексным механизмом патогенеза, в котором различные клеточные процессы настолько тесно взаимосвязаны, что невозможно определить, какой из них является ключевым для заболевания и как прервать цепь патологических событий. Конвенциональные подходы к исследованию БАС на посмертных образцах тканей пациентов позволяют лишь анализировать финальные стадии заболевания и его результат, а животные модели не до конца воспроизводят ключевые особенности БАС. Хотя клеточные модели пока и не могут воспроизвести архитектуру нервной ткани со всеми ее взаимодействиями, все же позволяют преодолеть эти ограничения, поэтому их разработка – одно из перспективных направлений в изучении нейродегенерации.

Несмотря на то, что определение конкретного процесса, инициирующего БАС, было бы гигантским шагом в сторону возможной лекарственной коррекции, поиск такого процесса может завести в тупик. Хотя, клинически, БАС выражается в гибели моторных нейронов и соответствующих симптомах, причина, лежащая в основе, может быть разной у разных пациентов. При этом, вне зависимости от этой причины, основным, что объединяет разные случаи БАС, является неспособность моторных нейронов функционировать на прежнем уровне и, как следствие, срыв адаптации. Одно из универсальных проявлений срыва адаптации – нарушение баланса между образованием и утилизацией активных форм кислорода, или окислительный стресс. Именно окислительный стресс можно использовать в качестве индикатора состояния больной клетки, а также маркера успешности коррекции патологии.

На сегодняшний день разработано большое количество генетически-кодированных биосенсоров для исследования широкого круга молекул и взаимодействий между ними. Обладая низкой степенью влияния на естественный ход процессов, они дают возможность наблюдать за ними в живой клетке в

реальном времени. Сенсоры основных участников процесса утилизации активных форм кислорода – перекиси водорода, глутатиона – и сенсоры pH позволяют не только фиксировать изменения целевых событий, но и оценивать их количественно, давая основу для сравнения между разными образцами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Ростовые среды и условия культивирования

1. Ростовая среда для культивирования фибробластов.
 - 1) 86% среды DMEM/F12 (Nutrient Mixture) (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 2 мМ GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific);
 - 4) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza);
 - 5) 0,1мМ раствор заменимых аминокислот (Lonza);
 - 6) 1мМ раствор пирувата натрия (Lonza).
2. Ростовая среда для культивирования мононуклеарных клеток периферической крови человека.
 - 1) Среда StemPro34 SFM (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 40x питательная добавка StemPro34 (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 2 мМ GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific);
 - 4) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza);
 - 5) Фактор роста стволовых клеток, SCF (50 нг/мл) (PeproTech);
 - 6) Инсулиноподобный фактор роста, IGF (40 нг/мл) (PeproTech);
 - 7) Интерлейкин-3, IL-3 (10 нг/мл) (PeproTech);
 - 8) Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста, GM-CSF (25 нг/мл) (PeproTech);
 - 9) Эритропоэтин (3,6 мкЛ/мл) (Биннофарм);
 - 10) Дексаметазон (1 мкг/мл) (Дальхимфарм).
3. Среда N2B27
 - 1) 95,5% среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 100x добавка N2 (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 50x добавка B27 (Thermo Fisher Scientific);
 - 4) 2 мМ GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific);
 - 5) 0,1мМ раствор заменимых аминокислот (Lonza);

- 6) 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma);
 - 7) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza);
 - 8) Основной фактор роста фибробластов bFGF (100 нг/мл) (Thermo Fisher Scientific).
4. Ростовая среда для ИПСК человека (для культивирования на слое митотически инактивированных фибробластов мыши)
- 1) 82% среды KnockOut DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 15% заменитель сыворотки KnockOut Serum Replacement – KoSR (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 2 мМ GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific);
 - 4) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza);
 - 5) 0,1мМ раствор заменимых аминокислот (Lonza);
 - 6) 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma);
 - 7) Основной фактор роста фибробластов bFGF (Thermo Fisher Scientific) 10 нг/мл.
5. Ростовая среда E8, для ИПСК человека (для культивирования на слое искусственного матрикса)
- 1) Базальная среда E8 (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 50x добавка E8 (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza).
6. Базовая среда для направленной дифференцировки ИПСК в моторные нейроны:
- 1) 48% среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific);
 - 2) 48% среды Neurobasal (Thermo Fisher Scientific);
 - 3) 200x бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific);
 - 4) 100x бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific);
 - 5) 2mМ GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific);
 - 6) 0,1 мМ раствор аскорбиновой кислоты (Wako).
- I этап дифференцировки:* + 3 мкМ CHIR99021 (StemRD), 2 мкМ SB431542 (Selleckchem), 2 мкМ DMH1 (Tocris).

II этап дифференцировки: + 1 мкМ CHIR99021 (StemRD), 2 мкМ SB431542 (Selleckchem), 2 мкМ DMH1 (Tocris), 0,5мкМ Purmorphamin (Stemgent), 0,1 мкМ ретиноевая кислота (Sigma).

III этап дифференцировки: + 3 мкМ CHIR99021 (StemRD), 2 мкМ SB431542 (Selleckchem), 2 мкМ DMH1 (Tocris), 0,5мкМ Purmorphamin (Stemgent), 0,1 мкМ ретиноевая кислота (Sigma), 0,5мМ вальпроевая кислота (Sigma).

IV этап дифференцировки: 0,1мкМ Purmorphamin (Stemgent), 0,5 мкМ ретиноевая кислота (Sigma)

V этап дифференцировки: 0,1мкМ Purmorphamin (Stemgent), 0,5 мкМ ретиноевая кислота (Sigma), 0,1 мкМ Compound E (EMDMillipore).

7. Среда для культивирования зрелых моторных нейронов:

- 1) 48% среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific);
- 2) 48% среды Neurobasal (Thermo Fisher Scientific);
- 3) 200х бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific);
- 4) 100х бессывороточная добавка B27 Minus AO (Thermo Fisher Scientific);
- 5) 1 мг/мл Доксциклина гиклат (Sigma);
- 6) 0,5 мкМ ретиноевая кислота (Sigma);
- 7) Ингибитор γ -секретазы, 0,1 мкМ Compound E (EMDMillipore).

8. Дефицитная среда для культивирования зрелых моторных нейронов

- 1) 48% среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific);
- 2) 48% среды Neurobasal (Thermo Fisher Scientific);
- 3) 100х бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific);
- 4) 1 мг/мл Доксциклина гиклат (Sigma);

Все типы клеток культивировали при 37°C и содержании CO₂ в атмосфере 5%. Культивирование первичных мононуклеарных клеток периферической крови проводилось в суспензии. После разморозки, аликвоты клеток высаживались в культуральную емкость, где культивировались на протяжении 5 дней, после чего собирались для репрограммирования к плюрипотентному состоянию.

ИПСК человека культивировали в двух различных режимах: на слое митотически инактивированных фибробластов мыши (фидер) и на искусственном матриксе (Matrigel, Corning). При культивировании на фидере, культуральную поверхность, предварительно обработанную 0,1% раствором желатина (Sigma), в

среде для фибробластов высаживали клетки фидера, которым давали осесть и прикрепиться к поверхности в течение 2-4 часов. ИПСК пересаживали на новый слой фидера следующим образом: аспирировали среду, промывали PBS, добавляли диссоциирующий агент TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific). Через 0.5-1 минуту аккуратно отбирали TrypLE Express, ресуспендировали клетки в желаемом объеме культуральной среды и пересаживали на свежеподготовленный слой фидера. При культивировании ИПСК на матриксе, пересадку производили при помощи неферментативного диссоциирующего агента – 5 mM ЭДТА (Thermo Fisher Scientific): аспирировали среду, промывали PBS, заливали ЭДТА на 5 минут, после чего аспирировали ЭДТА и ресуспендировали клетки в желаемом объеме среды. Все пересадки ИПСК сопровождалась добавлением в процессе ингибитора Rho-ассоциированной протеинкиназы - Y-27632 в концентрации 10 нг/мл (Sigma).

Нейроэпителиальные клетки, предшественники моторных нейронов и моторные нейроны культивировали на Matrigel. При пересадке, клетки промывали раствором PBS и обрабатывали ферментом Accutase (5-8 минут при 37°C), который инактивировали средой DMEM/F-12. Клетки пересаживались на новые культуральные поверхности в ростовую среду с Y-27632. При культивировании на матриксах Matrigel и Geltrex поверхность обрабатывалась согласно протоколам производителей.

Для заморозки, клетки снимали способом, применяемым для пересадки, и центрифугировали 200g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в среде для заморозки: 10% ДМСО, 90% NBCS (Newborn calf serum, сыворотка новорожденных телят) для ИПСК; 10% ДМСО, 10% КоSR, 80% DMEM/F-12 для предшественников моторных нейронов.

Суспензию клеток переносили в ампулы для заморозки, которые в изопропаноловых боксах помещали в кельвинатор на -70°C. Через 24 часа переносили ампулы в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Для разморозки, клетки быстро размораживали при 37°C, центрифугировали 200g в течение 5 минут, сливали надосадочную жидкость, а клеточный осадок ресуспендировали в теплой ростовой среде, содержащей Y-27632 и переносили в культуральную емкость.

2.2 Получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

2.2.1 Репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови к плюрипотентному состоянию

Репрограммирование мононуклеарных клеток к плюрипотентному состоянию проводили согласно опубликованному протоколу (Okita et al., 2013). Общая схема репрограммирования представлена на Рисунке 5. Мононуклеары периферической крови человека трансфецировали на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) тремя микрограммами смеси эписомных векторов: pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXB-EBNA-1 (Addgene IDs #41855-58, #41813-14) – согласно инструкции производителя. После электропорации клетки рассаживали на культуральную поверхность, покрытую матриксом Geltrex (Thermo Fisher Scientific), в соотношении 1×10^6 на 10 мм чашку Петри в ростовую среду для мононуклеаров. На следующий день меняли среду на N2B27 и культивировали клетки в течение двух недель, меняя среду через день. На 15-й день переводили культуру на среду E8, при этом смена среды производилась каждый день в течение одной-двух недель. Начиная с четвертой недели культивирования, первичные колонии ИПСК с ЭСК-подобной морфологией механическим способом переносили на культуральную поверхность на слой ЭФМ, или искусственный матрикс (Matrigel, Corning) в ростовую среду для ИПСК человека, или E8, соответственно (Рисунок 5).

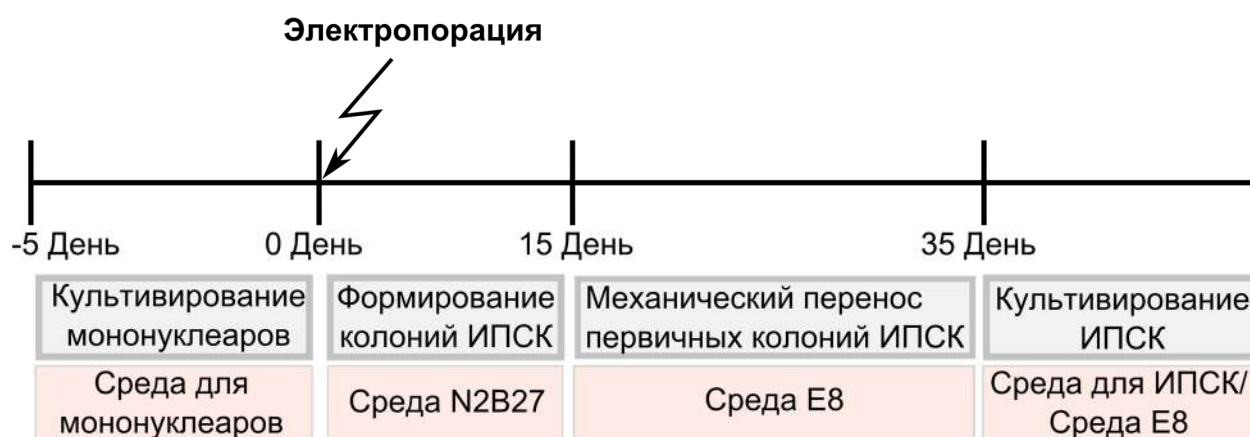


Рисунок 5. Общая схема репрограммирования мононуклеаров периферической крови человека к плюрипотентному состоянию.

2.2.2 Характеристика плюрипотентного статуса ИПСК

2.2.2.1 Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы

ИПСК, растущие на слое фидера, фиксировали высушиванием на воздухе в течение 10-15 минут. Для фиксации ИПСК, растущих на матриксе, клетки промывали PBS, фиксировали при помощи 4% формальдегида в течение 10 минут при комнатной температуре, после чего, опять промывали PBS 2 раза по 15 минут. Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы проводили согласно ранее описанному (Pain et al., 1996). Клетки визуализировали на микроскопе Nikon Eclipse TS100 с помощью программного обеспечения NIS-Elements D 4.12.00.

2.2.2.2 Иммунофлуоресцентное окрашивание на экспрессию маркеров плюрипотентности

Клетки дважды промывали PBS, фиксировали в 4% растворе формальдегида в течение 10 мин, затем отмывали PBS два раза по 15 мин. Пермеабиллизацию проводили при комнатной температуре с помощью 0,5% раствора Triton X-100 в течение 30 мин, затем снова отмывали PBS два раза по 15 мин. Далее лунки с клетками инкубировали при комнатной температуре 30 мин с блокирующим буфером (10 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина в PBS). Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C в течение ночи, со вторичными антителами при комнатной температуре 1,5-2 ч. После инкубации с первичными и вторичными антителами препараты клеток отмывали от несвязавшихся антител PBS два раза по 15 минут при комнатной температуре. Для окрашивания ядер препаратов использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, 1 мкг/мл в PBS). Анализ препаратов производили на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti. Список первичных и вторичных антител приведен в Приложении 1.

2.2.2.3 Выявление экспрессии маркеров плюрипотентности методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией

Первым шагом производили выделение РНК из клеток при помощи TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. Для очистки образцов РНК от контаминации геномной ДНК использовали набор реагентов DNA-free (Ambion), используя предложенный протокол. Раствор, содержащий

РНК, переносили в чистую пробирку и хранили при -70°C . Полученную РНК использовали для синтеза кДНК методом обратной транскрипции:

Для проведения одной реакции обратной транскрипции (20 мкл) смешивали

- 1) РНК – 1 мкг;
- 2) Random hexamer (Invitrogen) – 1 мкл;
- 4) H_2O – до 12 мкл.

Полученную смесь инкубировали 2 мин при 70°C , затем переносили на лед на 2 мин. После чего добавляли оставшиеся реагенты:

- 5) 5 \times OT-buffer-mix (Биолабмикс) – 4 мкл;
- 6) M-MuLV-RN ревертаза (Биолабмикс) – 1 мкл;
- 6) H_2O – 3 мкл.

Смесь инкубировали при комнатной температуре 10 мин, затем 60 мин при 42°C . Инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 70°C , разводили водой в 5-10 раз и хранили при -20°C .

Исследование уровня экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (Приложение 2) проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche). Реакции замешивали с использованием БиоМастер HS-qPCR (2 \times) (Биолабмикс) по рекомендации производителя. Полученные данные анализировали в Microsoft Excel методом $\Delta\Delta\text{Ct}$.

2.2.2.4 Спонтанная дифференцировка *in vitro*

Для спонтанной дифференцировки клетки наращивали до 85–90%-ной плотности, диссоциировали от поверхности культуральной емкости, инкубируя с коллагеназой IV типа (Sigma-Aldrich) в течение 20–30 мин при 37°C . Затем полученные агрегаты клеток аккуратно переносили в культуральную емкость, покрытую слоем 1%-ной агарозы для образования эмбрионных телец (ЭТ). Клетки культивировали в виде эмбрионных телец (ЭТ) в среде без основного фактора роста фибробластов (Basic fibroblast growth factor, bFGF) в течение двух недель, после чего распластывали на поверхности культуральных планшетов, покрытых Matrigel (Corning), и культивировали еще одну неделю.

Профиль дифференцировки оценивали при помощи иммунофлуоресцентной окраски на тканеспецифичные маркеры экто-, эндо- и мезодермы.

2.2.2.5 Анализ кариотипа

Анализ кариотипа полученных линий ИПСК проводили по протоколу, опубликованному ранее (Minina et al., 2007).

2.2.2.6 Выделение геномной ДНК и подтверждение наличия мутации D90A в гене SOD1

Для выделения геномной ДНК, клетки снимали TrypLE, ресуспендировали в PBS, переносили суспензию клеточную в 0,5 мл пробирки и центрифугировали 1500 Rpm в течение 5 минут. Затем убирали надосадочную жидкость, а к клеточному осадку добавляли Quick Extract (Lucigene) из расчета 20 мкл/1 см² площади, с которой были собраны клетки. Полученную смесь перемешивали на и инкубировали 15 минут при 65°C. После чего вновь перемешивали и инкубировали еще 5 минут при 98°C для инактивации реакции. Клеточный лизат разводили водой в 3-4 раза и использовали для ПЦР.

Участок экзона 4, содержащий искомую замену амплифицировали, используя праймеры T7-14-F/T7-14-R (см. Приложение 2). Полученный ПЦР-продукт очищали методом эллюции из агарозного геля и секвенировали по Сэнгеру.

2.2.2.7 Детекция микоплазменной инфекции и встройки эписом

Отсутствие инфекции микоплазмой и встройки последовательности эписом было проверено с помощью ПЦР геномной ДНК с праймерами Mусо-F/Мусо-R и EBNA-F/EBNA-R, соответственно (Приложение 2).

2.3 Создание изогенных линий ИПСК с внесенными мутациями в ген SOD1 с помощью CRISPR/Cas9

2.3.1 Получение и очистка белка Cas9 с сигналом ядерной локализации. Гидролиз ДНК с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов *in vitro*

Белок Cas9 с сигналом ядерной локализации (Cas9_NLS) был получен методом ферментации в штамме-продуценте *E. coli* Rosetta 2D. По протоколу, опубликованному ранее (Jinek et al., 2012). Полученный в результате белок был сконцентрирован на центрифужном концентраторе Amicon Ultra-15 (10000 NMWL, Merck) до концентрации 5 мкг/мкл (20 мкМ), расфасован и помещен на хранение при -70°C.

Для реакции гидролиза ДНК *in vitro* использовали 100-150 нг линеаризованной плазмиды, содержащей целевую последовательность ДНК. Для

гидролиза использовали молярное соотношение вектор:направляющая РНК:Cas9_NLS = 1:100:100. Объем реакции составлял 20 мкл. РНК и белок Cas9_NLS смешивали в реакционном буфере (5% глицерин, 20 мМ HEPES pH 7.5, 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0.5 мМ ЭДТА), выдерживали при комнатной температуре 10 мин для образования рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов РНК:Cas9_NLS, после чего добавляли 100 нг ДНК линейризованного вектора и инкубировали 3 часа при 37 °С. Реакцию инактивировали, добавлением 2 мкл 0,5М ЭДТА и 1,6 мкл протеинкиназы К (25мг/мл, Roche) к 20 мкл реакционной смеси, и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Результаты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

2.3.2 Доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 в ИПСК с помощью электропорации на приборе Neon Transfection system

ИПСК пересаживали за 48 часов до трансфекции в соотношении 1:3-1:4. В день трансфекции клетки снимали TrypLE, ресуспендировали до одноклеточного состояния в PBS, пропускали через клеточное сито (70 мкм, Miltenyl Biotech) и центрифугировали в течение 5 минут, 200g. Электропорацию ИПСК проводили на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкциям производителя, используя протокол: 1100 V, 30 мс, 1 импульс.

Для внесения однонуклеотидных замен в ген *SOD1* в клетки доставляли РНП + ssODN(single-strand oligodeoxynucleotide, одноцепочечный олигонуклеотид, IDT) донорную последовательность (100 пмоль/реакция). Для каждого варианта замены было проведено 2 реакции по 10 мкл.

Для создания трансгенных линий ИПСК, содержащих встройку последовательностей трансактиватора и биосенсоров, доставляли RNP + плазмидную ДНК (5 мкг/реакция). Для каждого раунда трансфекции было проведено по 2 реакции объемом по 100 мкл.

РНП комплексы (расчет на $1 \cdot 10^5$ клеток) готовили в день электропорации:

- 1) 20-100 пмоль crRNA (искусственно синтезированная crispr РНК, IDT) смешивали с эквивалентным количеством tracrRNA (искусственно синтезированная трансактивационная РНК, IDT) и инкубировали при 95 °С в течение 10 минут. После инкубирования, смесь охлаждали при комнатной

температуре в течение 5 минут. Последовательности crispr РНК, использованные для внесения двунитевых разрывов обозначены в Приложении 2.

2) К комплексу crRNA:tracrRNA добавляли 20 пмоль белка Cas9_NLS, аккуратно пипетируя. Инкубировали 20 минут при комнатной температуре.

Образованные комплексы Cas9_NLS+crRNA:tracrRNA добавляли к суспензии клеток непосредственно перед электропорацией, при необходимости дополняя ssODN, или плазмидным донором. После электропорации, клетки переносили в подготовленные культуральные планшеты, покрытые слоем фидера с теплой средой без антибиотика, содержащей Y-27632.

Для получения линий ИПСК, содержащих замены в гене *SOD1*, было использовано два подхода. В первом подходе клетки высаживали на 60 мм чашки Петри (1×10^5 клеток/60 мм) сразу после электропорации, где они образовывали колонии. Колонии по достижении приемлемого размера (через 4-5 дней после электропорации) субклонировали путем механической пересадки на 48-луночные планшеты, и наращивали для анализа. Во втором подходе, клетки высаживали на лунку 12-луночного культурального планшета после электропорации, на следующий день снимали TrypLE, пропускали через клеточное сито и подсчитывали концентрацию клеток в суспензии. Далее клетки рассаживали в три 96-луночных культуральных планшета, из расчета 3 клетки/лунка для субклонирования. В следующие 7 дней после субклонирования производили визуальный контроль планшетов на предмет наличия колоний. Лунки, в которых обнаруживали по одной колонии, пересаживали для наращивания клеточной массы и выделения геномной ДНК.

2.3.3 Анализ клонов на предмет наличия целевой замены

Для поиска клонов, содержащих целевые замены, клетки отдельно наращивали в 48-луночных культуральных планшетах. Далее выделяли геномную ДНК, как описано в разделе «Подтверждение наличия мутации D90A в гене *SOD1*».

2.3.3.1 Отбор клонов ИПСК с заменой G127R в гене *SOD1* с помощью qPCR

Для поиска клонов с заменой мы выбрали пару праймеров, амплифицирующих целевой участок (SOD1-8-F/SOD1-8-R), и два ПЦП-зонда

(Приложение 2): для гибридизации на последовательность дикого типа (G127G-WT-FAM), и для гибридизации на последовательность с целевой заменой (G127R-mut-VIC).

Для проведения одной реакции смешивали:

БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс) – 10 мкл;

Матрица ДНК – 30-50 нг;

Праймеры (10 мМ каждый) – по 0,8 мкл;

Зонд (10 мМ каждый) – по 0,5 мкл;

Вода – до 20 мкл.

Реакцию проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche) в течение 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин. После, отбирали образцы, которые продемонстрировали наличие сильного сигнала, соответствующего зонду G127R-mut. Исследуемый участок амплифицировали (T15-16-F/T15-16-R), ПЦР-продукт очищали и секвенировали по Сэнгеру для подтверждения целевой замены.

2.3.3.2 Отбор клонов ИПСК с заменой D90A в гене SOD1 с помощью tetra-primer ARMS-PCR

Праймеры для tetra-primer ARMS-PCR были подобраны с помощью ресурса <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> (Приложение 2). Для проведения реакции смешивали:

БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс) – 10 мкл;

Матрица ДНК - 30-50 нг;

D90A-inner-F (10мМ) – 0,5 мкл

D90A-inner-R (10мМ) – 1 мкл

D90A-outer-F (10мМ) – 0,5 мкл

D90A-outer-R (10мМ) – 0,2 мкл

Вода – до 20 мкл.

Реакция амплификации проходила с постепенным снижением температуры отжига на 0,5°C/цикл в течение первых 9 циклов:

Предварительная денатурация: 95°C – 3 минуты;

9 циклов:

Денатурация: 95°C – 60 сек;

Отжиг: 68°C - 64°C – 60 сек;

Элонгация: 72°C – 60 сек;

21 цикл:

Денатурация: 95°C – 60 сек;

Отжиг: 64°C – 60 сек;

Элонгация: 72°C – 60 сек;

Элонгация: 72°C – 3 минуты.

ПЦР-продукты анализировали в 2% агарозном геле, отбирали образцы, предположительно содержащие целевую замену, затем, амплифицировали интересующий участок гена SOD1 с помощью праймеров T7-14-F/T7-14-R (Приложение 2), очищали и секвенировали по Сэнгеру, используя те же праймеры

2.4 Получение трансгенных линий ИПСК, содержащих встройку последовательностей трансаktиватора для доксициклин-управляемой экспрессии и биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito- roGFP2-Orp1 в локусе *AAVS1*

2.4.1 Доставка компонентов CRISPR/Cas9 и донорных плазмид в ИПСК

Для встройки последовательностей биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в локус *AAVS1* использовали электропорацию RNP-комплексов белка Cas9 и направляющей РНК и донорных плазмид: *AAVS1-Neo-M2rtTA* (Addgene # 60843) и *pCyto-roGFP2-Orp1-donor/pMito-roGFP2-Orp1-donor*, сконструированных сотрудником лаборатории эпигенетики развития Медведевым Сергеем Петровичем (Приложение 3). Каждой донорной плазмиды брали по 2,5 мкг/реакция, для каждого биосенсора проводили по 2 реакции. Электропорацию ИПСК проводили, как это описано в разделе «Доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 в ИПСК с помощью электропорации на приборе Neon Transfection system».

После электропорации, ИПСК высаживали на 10 мм чашки Петри на слой фидера в теплую среду, содержащую Y-27632.

2.4.2 Селекция ИПСК, содержащих целевые встройки

Перед началом экспериментов для каждой линии ИПСК методом титрования была определена оптимальная концентрация пурамицина дигидрохлорида и неомицина сульфата, необходимая для элиминации ИПСК, не содержащих соответствующих генов устойчивости к антибиотикам.

Через 48-72 часа после трансфекции, для поиска клонов клеток, содержащих встройку последовательностей биосенсоров, производили культивирование ИПСК на селективной среде, содержащей пуромицина дигидрохлорид (Sigma). Селекция проводилась в течение 3 дней в среде для ИПСК. На 3 сутки после селекции меняли селективный антибиотик на неомицина сульфат (Sigma) и культивировали дополнительные 4-5 дней в среде E8. По окончании селекции, клеткам добавляли в среду доксициклина гиклат (Sigma) в концентрации 2 мкг/мл.

Через 24 часа после отмены антибиотика проводили визуальный контроль выживших колоний на предмет наличия флуоресцентного сигнала на микроскопе Nikon Eclipse Ti2 (Nikon) и механическое выделение устойчивых колоний ИПСК с их последующим переносом в отдельные лунки 48-луночных культуральных планшетов для культивирования и анализа.

2.4.3 Выявление рекомбинантных клонов при помощи ПЦР

Выделение геномной ДНК из клеток осуществляли при помощи реагента Quick Extract DNA Extraction Solution (Epicentre) по протоколу производителя и хранили на -20°C . Амплификацию фрагментов проводили с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2 \times) по протоколу производителя.

Для выявления клонов клеток, в которых произошла CRISPR-опосредованная встройка трансгена в целевой сайт, были использованы праймеры, указанные в Приложении 2.

2.5 Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны. Исследование поведения моторных нейронов в ответ на стресс с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1

2.5.1 Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны

Направленную дифференцировку ИПСК в моторные нейроны проводили согласно опубликованному ранее протоколу (Du et al., 2015). Процесс дифференцировки схематично представлен на Рисунке 6.

Предварительно ИПСК переводили в систему культивирования на Matrigel в среде E8. Пересадки на всех этапах дифференцировки велись Accutase (Gibco) в соотношении 1:5-1:6 с добавлением Y-27632 в концентрации 10 нг/мл. Смену среды производили каждый день на всех этапах, за исключением первого. На 5

этапе дифференцировки среду меняли каждый день, отбирая половину старой среды и добавляя эквивалентный объем новой среды. Свежую среду, содержащую факторы дифференцировки, готовили каждый день в нужном количестве.

Для наращивания моторных нейронов для анализа экспрессии генов – маркеров моторных нейронов – клетки сажали в плотности $3-4 \times 10^6$ клеток на 20 мм чашки Петри, покрытые Matrigel в среду для дифференцировки V этапа.

Для исследования клеточных процессов с помощью биосенсоров посредством лазерной сканирующей микроскопии, клетки сажали на Cell imaging coverglass (Eppendorf) в 33% Matrigel. Для этого клетки после центрифугирования ресуспендировали в 1,5х-кратной среде для V этапа дифференцировки, содержащей 0,75 мкМ ретиноевую кислоту, 0,15 мкМ Purmorphamin, 0,15 мкМ Compound E и 15 нг/мл Y-27632 из расчета $1,2-1,5 \times 10^5$ клеток/70 мкл и ставили в лед. К 70 мкл холодной клеточной суспензии добавляли 35 мкл Matrigel, перемешивали пипетированием и аккуратно наносили на дно ячейки предварительно охлажденного Cell imaging coverglass, распределяя наконечником пипетки жидкость по поверхности. После нанесения, Cell imaging coverglass ставили на охлаждающий штатив, перевернутый вверх дном и покрытый бумажной салфеткой на 10 минут. Затем переносили клетки на поверхность рабочего стола и оставляли для полимеризации еще на 10 минут при комнатной температуре. Постепенный подъем температуры позволяет большей части клеток оказаться в одной оптической плоскости, что необходимо для съемки. После чего клетки переносили в CO₂-инкубатор для продолжения стабилизации матригеля еще на 1 час. Через 1 час, на стабилизированный слой матригеля с клетками аккуратно добавляли 300-400 мкл среды V этапа дифференцировки, содержащей 10 нг/мл Y-27632.

Продолжительность заключительного этапа дифференцировки составляла десять дней и приводила к формированию зрелых моторных нейронов. По окончании дифференцировки клетки переводились на среду для культивирования зрелых моторных нейронов.

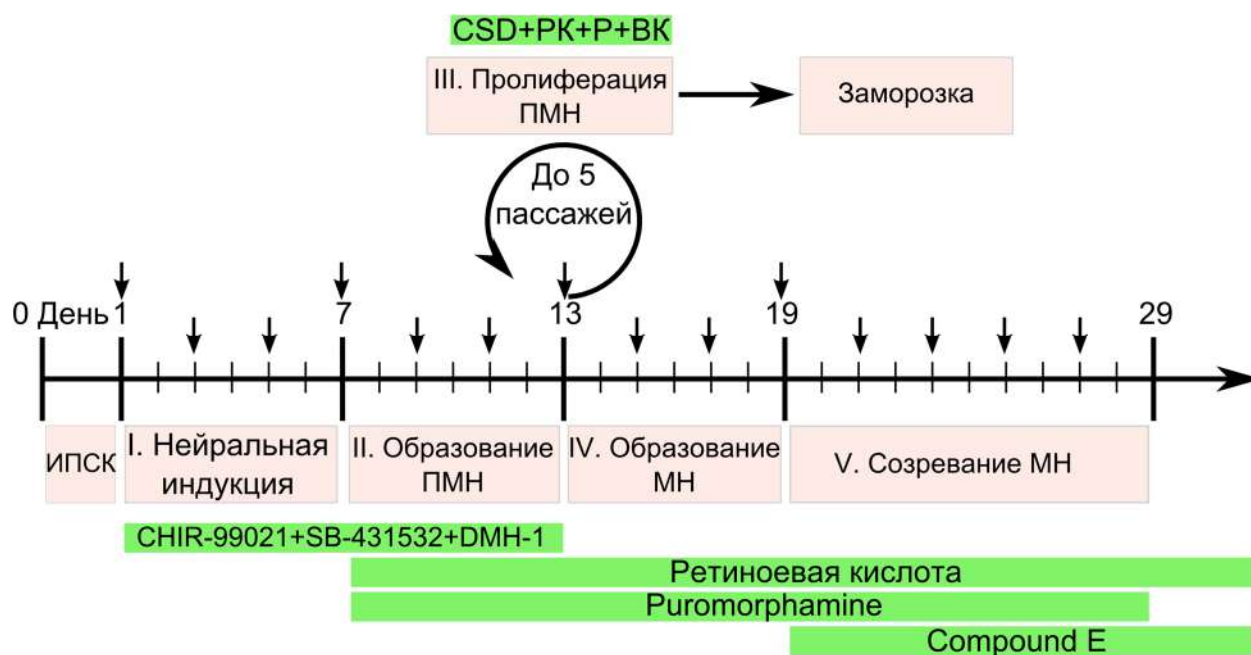


Рисунок 6. Схема дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в моторные нейроны (МН) по дням. Переход от одного этапа дифференцировки к другому (кроме перехода от ИПСК к нейральной индукции) осуществляется путем пересадки клеток в среду, содержащую соответствующие факторы. В конце этапа образования предшественников моторных нейронов (ПМН) возможно культивирование ПМН с целью увеличения их количества и заморозка ПМН. Стрелками обозначены дни добавления Доксциклина в культуральную среду. CSD – комбинация факторов CHIR-99021+SB-431532+DMH-1, РК – Ретиноевая кислота, Р – Puromorphamine, ВК – Вальпроевая кислота.

2.5.2 Характеристика направленной дифференцировки ИПСК с моторные нейроны

2.5.2.1 Определение экспрессии маркеров зрелых моторных нейронов методом количественной PCR в реальном времени. Определение экспрессии биосенсоров *Cyto-roGFP2-Orp1* и *Mito-roGFP2-Orp1*.

На 30 день дифференцировки клетки собирали и ресуспендировали в растворе Trizol. Полученный лизат либо помещали на хранение на -70°C , либо приступали к выделению РНК и синтезу кДНК как это описано в разделе «Выявление экспрессии маркеров плюрипотентности методом ПЦР с обратной транскрипцией». Полученную кДНК использовали для анализа экспрессии генов-маркеров зрелых моторных нейронов *HB9*, *ISL1*, *CHAT* и биосенсоров *Cyto-roGFP2-Orp1* и *Mito-roGFP2-Orp1* в зависимости от условий дифференцировки (Приложение 2).

2.5.2.2 Определение доли ISL1⁺ клеток методом проточной цитометрии

Для выявления доли моторных нейронов, положительно окрашивающихся на ISL1, клетки на 20 день дифференцировки (1 день созревания) дезагрегировали от поверхности культурального пластика с помощью Accutase (Lonza), ресуспендировали в холодном PBS, подсчитывали количество и центрифугировали в течение 5 минут на скорости 400g в 15 мл пробирках (далее все этапы центрифугирования на тех же параметрах), полученный осадок ресуспендировали в 1 мл холодного 4% формальдегида и инкубировали на льду в течение 10-15 минут. После, добавляли 1 мл холодного PBS и центрифугировали, отбирали супернатант, оставляя около 100 мкл, в которых ресуспендировали клеточный осадок. К осадку добавляли 1 мл ледяного 100% метанола и инкубировали на льду в течение 10-15 минут, после чего добавляли 1 мл холодного PBS и центрифугировали. Отбирали супернатант, оставляя около 100 мкл, в которых ресуспендировали клеточный осадок. Осадок дважды промывали 2 мл раствора для проточной цитометрии (1%BSA, 0,2 μ M EDTA, PBS) и ресуспендировали в этом же растворе из расчета $1 \cdot 10^6$ клеток/мл.

К 100 мкл суспензии добавляли 2 мкл антител к ISL1 и инкубировали ночь при +4°C. К суспензии добавляли 1 мл раствора для проточной цитометрии и центрифугировали. Отбирали супернатант, ресуспендировали осадок в 100 мкл нового раствора для проточной цитометрии и добавляли вторичные антитела и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Подсчет ISL-позитивных клеток осуществляли на приборе FACSAria (BD biosciences).

2.5.2.3 Измерение длины аксональных отростков моторных нейронов

Для измерения длины аксональных отростков, моторные нейроны рассаживали на V этап дифференцировки в плотности $1,5 \cdot 10^4$ кл/см² на Cell imaging coverglass. На 21 день дифференцировки получали изображения (20 полей зрения) нейронов с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 на увеличении 20x, используя флуоресценцию сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в качестве маркера контуров клеток. В программе ImageJ производили измерение длины отростков отдельно лежащих клеток. Для каждого образца была подсчитана средняя длина аксонов, полученная в результате дифференцировки трех отдельных

клонов ИПСК. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

2.5.3 Исследование реакции моторных нейронов на добавление H_2O_2 в культуральную среду с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в реальном времени

2.5.3.1 Подготовка клеток к съемке

Накануне съемки, меняли среду на дефицитную среду для культивирования зрелых моторных нейронов. В день съемки среду меняли на подогретый до 37 °C солевой раствор HBSS +Ca²⁺, +Mg²⁺ (далее по тексту «HBSS») и инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение одного часа для удаления остатков фенола красного и компонентов среды из слоя Matrigel. После чего отбирали HBSS, оставив небольшое количество (~50 мкл/ячейка), и заливали свежий HBSS (300 мкл/ячейка).

2.5.3.2 Приготовление стоковых и рабочих растворов

Перед съемкой каждой линии проводили калибровку биосенсоров с помощью ДТТ и Диамида. Для этого готовили стоковые растворы 1М ДТТ и 0,2М Диамид в воде. Для исследования ответа на H₂O₂ готовили стоковый раствор 10мМ H₂O₂ в воде. Ввиду низкой стабильности, все растворы готовились в день съемки.

Затем, из стоковых растворов готовили рабочие растворы:

- 1) 10 мкл 1М ДТТ +190 мкл HBSS;
- 2) 5 мкл 0,2М Диамид + 195 мкл HBSS;
- 3) 2 мкл 10 мМ H₂O₂ + 198 мкл HBSS.

2.5.3.3 Настройка микроскопа

Для съемки был использован конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM-780 (объектив Plan-Apochromat 20x), оборудованный 488 нм аргоновым лазером и 405 нм ультрафиолетовым диодным лазером, климатической камерой с подключенными модулями поддержания температуры и подачи углекислого газа.

Cell imaging coverglass с клетками помещали на предметный столик микроскопа, снимали крышку, накрывали CO₂-рамкой и оставляли на 5-10 минут для уравнивания температуры климатической камеры. Пробирки с рабочими

растворами также ставили внутрь климатической камеры. В это время клетки визуализировали проходящим светом для контроля фокуса.

Перед калибровкой биосенсоров в программном обеспечении микроскопа ZEN black 2010 устанавливали начальные настройки микроскопа, обозначенные в Таблице 3, при необходимости, изменяя параметры «Attenuator» и «Gain», для достижения оптимального качества изображения. Далее калибровку и съемку проводили согласно протоколу, опубликованному ранее (Morgan et al., 2011) с модификациями.

Таблица 3. Начальные установки LSM-780 для измерения Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в моторных нейронах.

Параметр	Значение
Channels:	
Switch track every	«Frame»
Track 1	405 (DAPI) + T PMT
Track 2	488 (EGFP)
Light Path	
Track 1+ Track 2	500-530
Acquisition mode:	
Scan mode	Frame
Frame size	512x512 (1024x1024 для фотографий)
Scanning speed (pixel dwell)	9 (1,58 μ sec)
Averaging	1
Bit depth	16 bit
Zoom	0,6
Channel/Laser settings	
405-nm line	
Attenuator (transmission)	5%
Pinhole	74,5
Gain	800
Digital gain	1
488-nm line	

Attenuator (transmission)	2%
Pinhole	74,5
Gain	800 – Cyto-roGFP2-Orp1, 700 - Mito-roGFP2-Orp1
Digital gain	1

2.5.3.4 Калибровка биосенсоров *Cyto-roGFP2-Orp1* и *Mito-roGFP2-Orp1*

В зависимости от яркости флуоресценции настройки варьировали для достижения оптимального качества изображения на обоих каналах: высокое отношение сигнал/шум, отсутствие перенасыщенных участков. ВАЖНО! Значение Pinhole должно оставаться одинаковым для обоих каналов.

Для определения состояний максимального восстановления и окисления, клетки обрабатывали ДТТ и Диамидом, соответственно, по следующей процедуре:

1) В режиме «Position» устанавливали по 3 поля зрения в двух соседних ячейках, сохранив их координаты.

2) В режиме «Time series» настраивали съемку 18 циклов по 90 секунд.

3) Снимали три цикла по 90 секунд, после чего приостанавливали съемку и добавляли по 50 мкл рабочих растворов ДТТ (конечная концентрация 5мМ) и Диамида (конечная концентрация 0,5 мМ). Возобновляли съемку.

4) Сигнал биосенсора в обоих каналах начинал меняться спустя 1-2 минуты. Снимали оставшиеся 15 циклов, или меньше, если сигналы после резких изменений выходили на плато и больше не изменялись: сенсор достиг полностью восстановленного/окисленного состояния.

5) Если после калибровки появлялись перенасыщенные участки изображения, корректировали настройки. Если настройки были изменены, делали фотографии выбранных точек с новыми настройками. Во всех последующих экспериментах выбранные настройки оставались неизменными.

Калибровку выполняли для каждой исследуемой линии и при каждом отдельном запуске дифференцировки.

2.5.3.5 Съемка реакции моторных нейронов в ответ на добавление H_2O_2 в среду

Для съемки клеток использовали настройки микроскопа, определенные при калибровке.

- 1) В режиме «Positions» выбирали 4-8 полей зрения и сохраняли координаты.
- 2) В режиме «Time series» настраивали съемку 33 циклов по 3 минуты.
- 3) Снимали три цикла по 3 минуты, после чего приостанавливали съемку и добавляли 50 мкл рабочего раствора H₂O₂. Возобновляли съемку и снимали оставшиеся 30 циклов. Общее время съемки – 1,5 часа.

2.5.3.6 Обработка и анализ изображений

Полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ согласно процедуре, описанной в ранее (Morgan et al., 2011). Результаты нормировали на значения максимально восстановленных и максимально окисленных клеток, полученные во время калибровки по формуле:

$$\left(\frac{roGFP_{ox}}{roGFP_{red}}\right) - \left(\frac{roGFP_{oxДТТ}}{roGFP_{redДТТ}}\right) / \left(\frac{roGFP_{oxДиаמיד}}{roGFP_{redДиаמיד}}\right) -$$

$\left(\frac{roGFP_{oxДТТ}}{roGFP_{redДТТ}}\right)$. Нормализованные значения использовали для построения графиков изменения сигналов биосенсоров и статистической оценки наблюдаемых изменений в Microsoft Excel. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

2.5.4 Исследование реакции моторных нейронов в условиях хронической эксайтотоксичности с помощью биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1

Для моделирования хронической эксайтотоксичности, на последний день дифференцировки, в среду добавляли 20 мкМ Глутамат натрия (Sigma) и 100 мкМ ингибитор обратного захвата глутамата L-транс-пирролидин-2,4-дикарбоновая кислота (ПДК, Sigma) на 5 суток, меняя среду через день (Hedlund et al., 2010).

На 5й день с помощью лазерной сканирующей микроскопии получали изображения сигналов биосенсора, которые далее анализировали. Далее, производили исследование реакции моторных нейронов в ответ на добавление H₂O₂ в среду после глутаматного стресса. Изображения обрабатывали, используя ImageJ. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

С момента появления в арсенале исследователей, методы направленного редактирования генома нашли применение в различных сферах биологии и медицины. Особенно активно они разрабатываются в качестве потенциальных инструментов для генной терапии наследственных заболеваний. Тем не менее, редактирование генов может быть полезно и в обратном направлении – для создания моделей болезней. Такой подход, например, может быть использован, если нет возможности получить клетки от донора ввиду экстремальной редкости патологии. Или для создания изогенных клеточных линий, различающихся лишь внесенной мутацией, что позволяет исследовать ее эффект без поправки на генетический фон пациента.

Согласно Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database (<https://alsod.ac.uk/>), известно более 180 мутаций гена *SOD1*, связанных с развитием БАС. Примечательно то, что клинические проявления заболевания: от возраста манифестации, до наличия, или отсутствия дополнительных неврологических нарушений – различаются у пациентов с разными мутациями. Сложно сказать, связано ли это с тем, что мутации по-разному сказываются на работе белка *SOD1*, или, опять же, это – влияние генов-модификаторов. 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.

Используя систему CRISPR/Cas9, мы внесли две точечные замены в последовательность гена *SOD1*, получив, тем самым, панель изогенных линий ИПСК.

3.1.1 Получение, очистка и функциональный анализ белка Cas9

Самым частым способом доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в культивируемые клетки на сегодняшний день служит трансфекция плазмид, кодирующих Cas9, направляющую РНК и репортерные конструкции. Главным лимитирующим фактором в доставке компонентов системы CRISPR/Cas9 в виде

плазмиды становится ее большой размер: более 9 т.п.н. для pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene № 48138). Поэтому, для получения ИПСК с заменами было принято решение использовать CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП).

Белок Cas9 с сигналом ядерной локализации для формирования РНП был наработан и очищен совместно с сотрудником лаборатории геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН Кулишовой Л. М. методом ферментации в *E. coli* (Jinek et al., 2012) (Рисунок 7а). В системе *in vitro* белок продемонстрировал наличие целевой активности в отношении ДНК в присутствии направляющей РНК, и отсутствие неспецифической нуклеазной активности (Рисунок 7б)

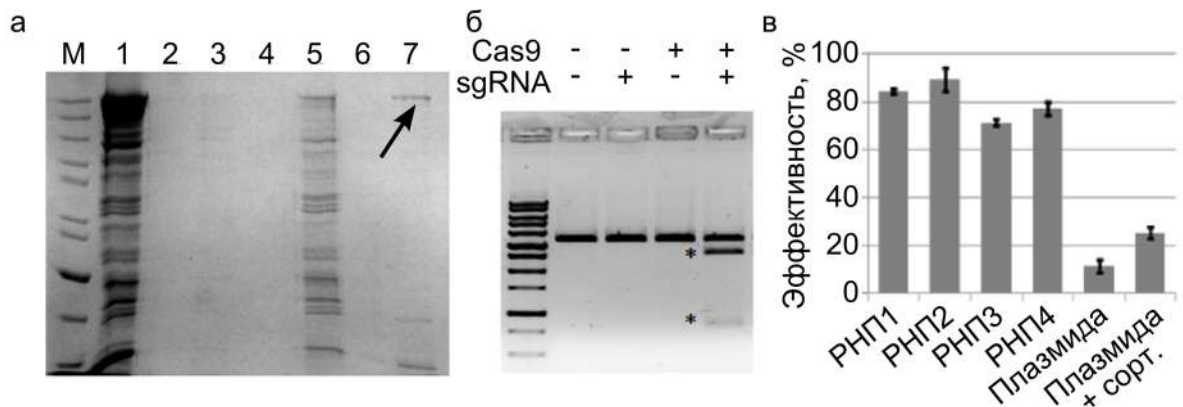


Рисунок 7. Гидролиз ДНК с помощью рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов белка Cas9. а – белковый гель-электрофорез в полиакриламидном геле: М – маркер, 1 – лизат *E. coli*, 2-6 различные фракции элюата Cas9, 7 – Финальный продукт: очищенный и сконцентрированный Cas9, стрелкой обозначен бэнд, соответствующий Cas9, размером 200 кДа; б – гидролиз целевой последовательности ДНК *in vitro*. В качестве субстрата для гидролиза использована линейаризованная плазида, содержащая целевую последовательность ДНК (часть локуса *AAVS1*). Продукты гидролиза ДНК обозначены *; в – сравнительная эффективность редактирования с помощью CRISPR/Cas9 *in vivo* в зависимости от типа доставки компонентов CRISPR/Cas9: 4 вида РНП с разными направляющими РНК против 4 экзона гена *SOD1*, плазида рХ458, кодирующая Cas9 и направляющую РНК против 4 экзона гена *SOD1* (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение).

Доставка CRISPR/Cas9 в виде РНП также оказалась более эффективной по сравнению с плазмидой при трансфекции клеток линии НЕК293Phoenix (Рисунок 7в). Подобный результат можно объяснить как высокой эффективностью доставки РНП внутрь клетки, так и тем фактом, что двунитевой разрыв после трансфекции

НП происходит практически сразу после электропорации, до первого деления клетки, пока концентрация комплексов CRISPR/Cas9 достаточно высока.

3.1.2 Получение линий ИПСК, содержащих замены с.272A>C (D90A) и с.382G>C (G127R) в гене *SOD1*

Для создания изогенных линий ИПСК, мутантных по *SOD1*, мы выбрали варианты мутаций в кодирующей области гена, которые приводят к заменам аминокислот в белке: с.272A>C, приводит к смене аспарагиновой кислоты на аланин (D90A); с.382G>C, приводит к смене глицина на аргинин (G127R). В качестве исходной для получения 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). Анализ клинического экзома донора клеток, из которых была получена данная линия, не выявило каких-либо мутаций, ассоциированных с заболеваниями (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR11413027>). Поэтому, эту же линию мы использовали далее в работе в качестве здорового контроля.

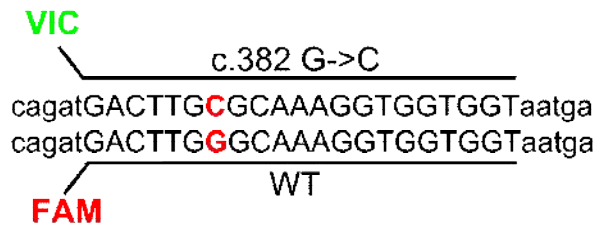
Для осуществления CRISPR-опосредованного двунитевого разрыва в гене *SOD1* были подобраны направляющие РНК, содержащие последовательности спейсеров для узнавания соответствующих участков гена *SOD1*. В качестве матрицы для гомологичной рекомбинации для внесения замен были использованы одноцепочечные олигонуклеотиды, концы которых были модифицированы фосфотиоатными связями для обеспечения их устойчивости к действию клеточных нуклеаз (Приложение 2).

В процессе электропорации и субклонирования ИПСК было получено 66 клонов для замены с.272A>C и 112 клонов для замены с.382G>C. Поскольку клетки, в которых произошли целевые события, ничем не отличаются от остальных, было необходимо разработать метод скрининга, который позволил бы отобрать клоны с заменой, без использования секвенирования.

Первоначально, мы обратились к методу количественной ПЦР с зондами. В таком подходе, используя в одной реакции два зонда: для гибридизации с последовательностью дикого типа и для гибридизации с последовательностью с заменой – можно найти образцы с мутацией, которые отличаются наличием сигнала от соответствующего зонда (Рисунок 8а, 8б). Для двух вариантов мутаций

были подобраны пары праймеров, амплифицирующие соответствующие участки *SOD1* и пары зондов (Приложение 2).

а



б

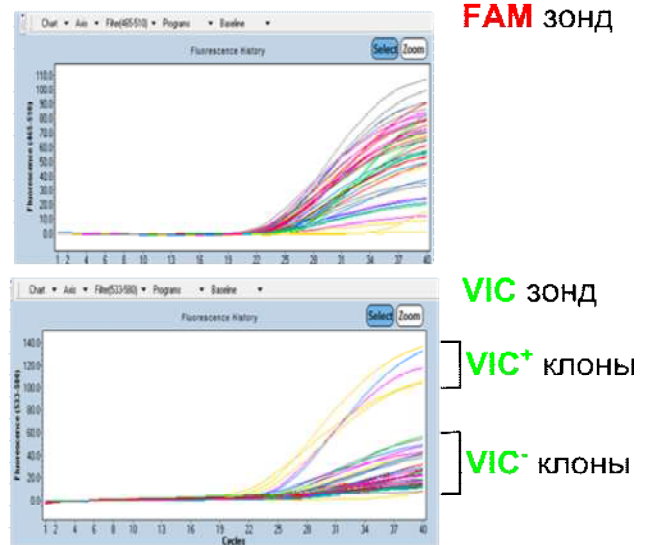


Рисунок 8. Выявление клонов ИПСК с заменой с.382G>C с помощью количественной ПЦР в реальном времени. а – схема гибридизации зондов на геномную ДНК; б – примеры сигналов, полученных от разных образцов ДНК на каналах, соответствующих дикому типу и замене с.382G>C. Показана обособленная популяция клонов, отличающаяся сильным сигналом, соответствующим замене (VIC⁺ клоны).

Чувствительность данного метода оказалась невысокой, но все же достаточной в случае с мутацией с.382G>C, чтобы можно было выделить ряд клонов, предположительно, имевших целевую замену. Для окончательного подтверждения мутации, мы секвенировали участок 5 экзона гена *SOD1* этих клонов.

К сожалению, в случае с мутацией с.272A>C, этот метод не был успешен: гибридизация зондов происходила вне зависимости от того, какой вариант последовательности присутствовал в образце. Поэтому, было необходимо применить другой подход для обнаружения замен.

Для этого мы использовали tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al., 2001), метод, обычно применяемый для скрининга однонуклеотидных полиморфизмов в популяции. Он основан на наличии у праймеров строгой чувствительности к несоответствиям на 3'-конце при гибридизации с матрицей. Имея в реакционной смеси два таких праймера: один для гибридизации с вариантом дикого типа, второй

– для гибридизации с заменой – можно получать разные ПЦР продукты, которые, затем, анализировать с помощью рутинного электрофореза (Рисунок 9).

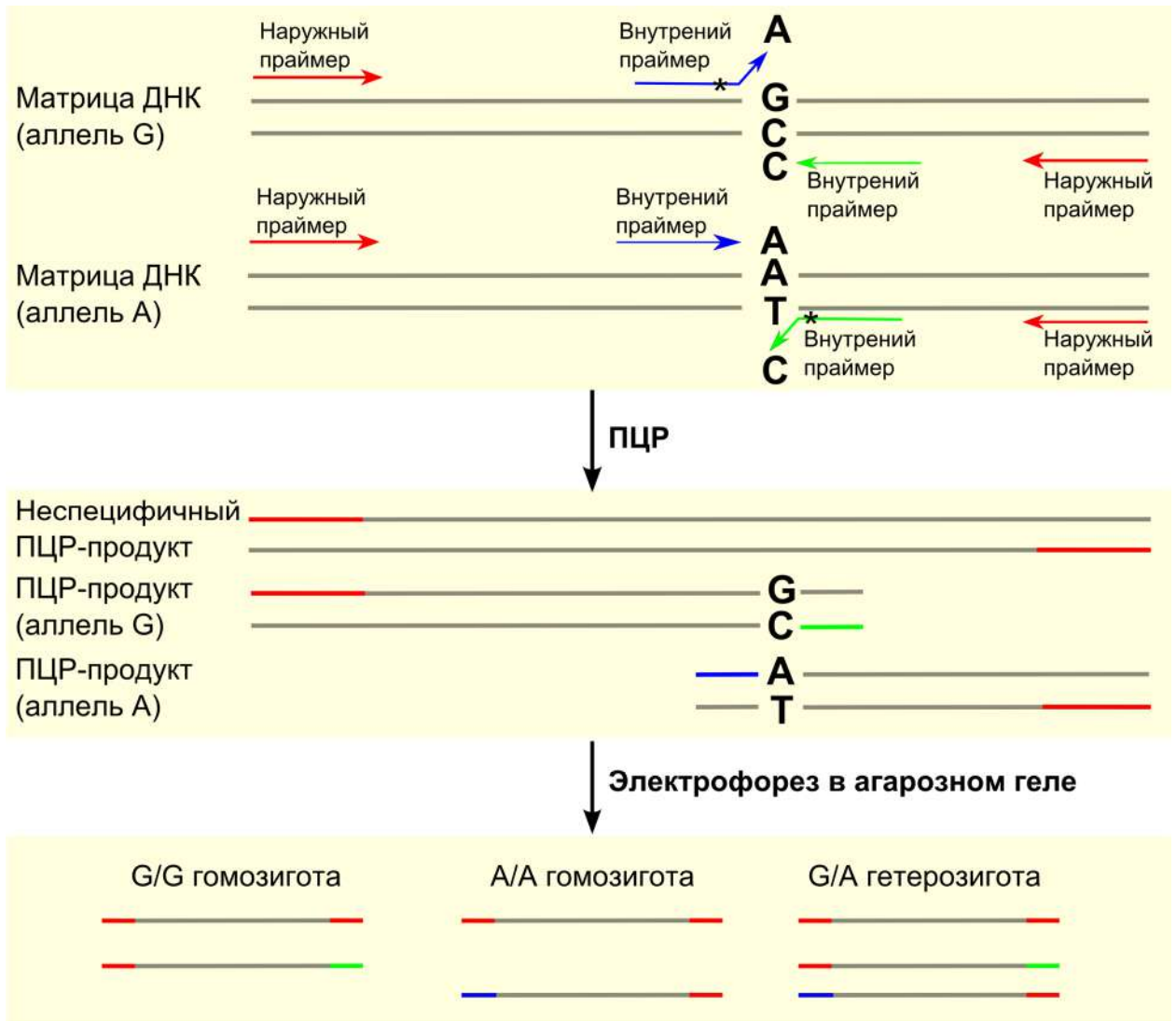


Рисунок 9 (по Ye *et al.*, 2001). Схема анализа однонуклеотидных замен с помощью метода tetra-primer ARMS-PCR на примере замены G → A. G-специфичный ПЦР-продукт образуется в результате амплификации с одним специфичным внутренним праймером (обозначен зеленой стрелкой) и одним из наружных праймеров. A-специфичный ПЦР-продукт образуется в результате амплификации с другим специфичным внутренним праймером (обозначен синей стрелкой) и одним из наружных праймеров. Специфичность связывания внутренних праймеров с последовательностью, содержащей G, или A обеспечивается за счет гибридизации 3'-конца праймеров с интересующей областью. Для увеличения специфичности в последовательности внутренних праймеров внесены дополнительные замены в -2 положении с 3'-конца (отмечены *). Наружные праймеры обеспечивают амплификацию и определяют размер специфичных продуктов, что необходимо для их различения на электрофорезе в агарозном геле.

Таким образом, был обнаружен ряд клонов, предположительно содержащих замену с.272A>C (Рисунок 10). Для подтверждения наличия замены, мы секвенировали участок 4 экзона гена *SOD1* этих клонов.

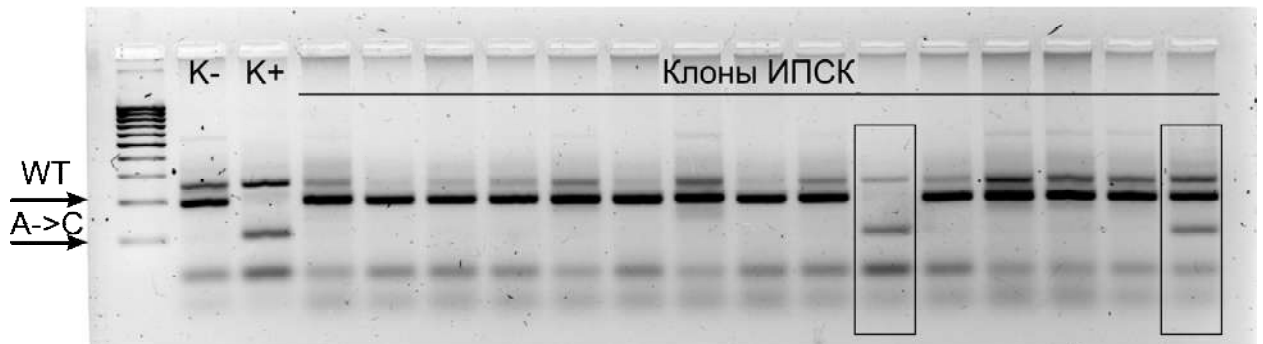


Рисунок 10. Электрофорез ПЦР-продуктов tetra-primer ARMS-PCR для скрининга замены с.272A>C. К- – отрицательный контроль, геномная ДНК линии K7-4, К+ – положительный контроль, геномная ДНК линии iALS (гомозиготная мутация с.272A>C в гене *SOD1*), WT – обозначение продукта, получаемого с последовательности дикого типа, А->С – обозначение продукта, получаемого с последовательности с заменой. В рамках обозначены клоны, предположительно содержащие целевую замену.

В результате анализа клонов, полученных после трансфекции CRISPR/Cas9 и донорных одноцепочечных нуклеотидов, был получен ряд линий ИПСК с различными вариантами аллелей гена *SOD1*:

- 1) D90A/wt
- 2) D90A/del 5 п.н.
- 3) D90A/del 105 п.н. (Затрагивает границу между 3 интроном и 4 экзоном. Приводит к нарушению сплайсинга мРНК *SOD1*, где сразу за 3 экзоном следует 5, и сдвигу рамки считывания)
- 4) D90A/ins 1 п.н.
- 5) G127R/del 5 п.н. (Приводит к образованию стоп кодона в 130 позиции)
- 6) G127R/del 9 п.н.
- 7) G127R/K128X
- 8) G127R/ins1 п.н.

Для дальнейших экспериментов были выбраны линии *SOD1*^{D90A/del105} п.н. (*SOD1*-D90A) и *SOD1*^{G127R/K128X} (*SOD1*-G127R), которые также были охарактеризованы на предмет соответствия критериям плюрипотентных стволовых клеток человека по стандартной процедуре (Рисунок 11).

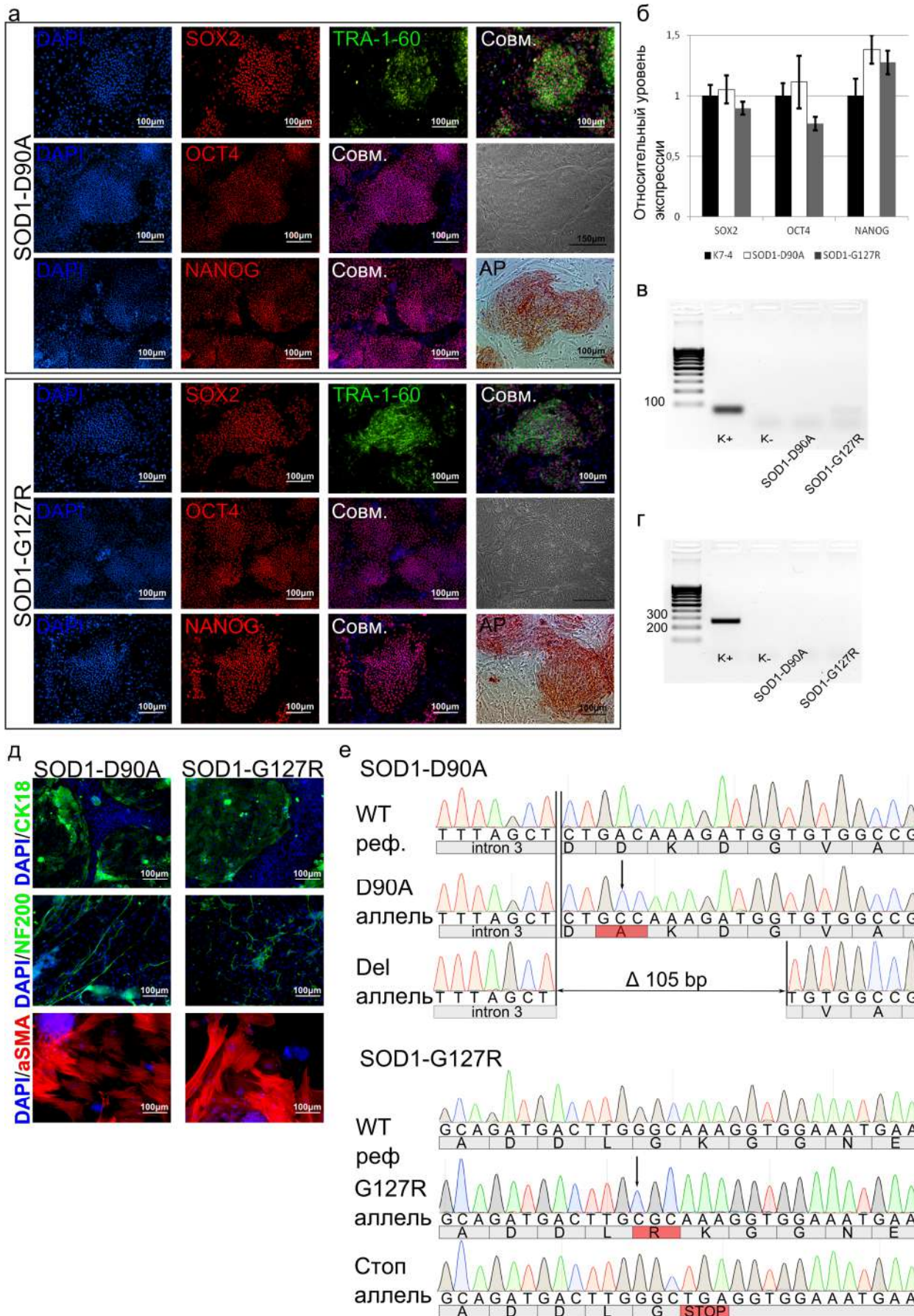


Рисунок 11. Характеристика изогенных линий ИПСК SOD1-D90A и SOD1-G127R с мутациями в гене SOD1. а – иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов SOX2, OCT4, NANOG и

поверхностному антигену TRA-1-60. Ядра окрашены DAPI. Морфология колоний ИПСК и экспрессия эндогенной щелочной фосфатазы (AP – alkaline phosphatase). Совм. – совмещение; б – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов-маркеров плюрипотентности SOX2, OCT4, NANOG. Значения нормализованы на уровень экспрессии в исходной линии ИПСК K7-4 (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение); в – электрофорез продуктов ПЦР-амплификации общего участка эписомных векторов. К+ - положительный контроль, К- – вода; г - электрофорез продуктов ПЦР-амплификации участка гена, кодирующего РНК 16s субъединицы рибосом микоплазмы. К+ - положительный контроль, К- – вода; д – иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию маркеров производных трех зародышевых листков: энтодермы (CK18, цитокератин 18), мезодермы (αSMA, гладкомышечный актин), эктодермы (NF200, нейрофиламент 200) после спонтанной дифференцировки *in vitro*. Ядра окрашены DAPI; е – Секвенограмма 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.

3.2 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 D90A в гене *SOD1* (*SOD1^{D90A/D90A}*), которую далее использовали в качестве положительного контроля.

В качестве источника для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мы использовали мононуклеарные клетки (МК), выделенные из периферической крови больного наследственной формой бокового амиотрофического склероза. Выбор мононуклеарных клеток крови для репрограммирования был обусловлен, в первую очередь, простотой получения биологического материала у пациента. МК были получены сотрудником ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва) Ветчиновой А. С, заморожены в жидком азоте и переданы для дальнейших экспериментов автору.

После разморозки и непродолжительного культивирования, в МК посредством электропорации доставляли набор эписомных векторов для репрограммирования. Использование эписомных векторов позволило избежать случайных интеграций чужеродных последовательностей в геном, что могло бы

иметь нежелательное влияние на дальнейшие эксперименты. После электропорации, в течение первых 11-13 дней было отмечено появление скоплений клеток небольшого размера, растущих группами. В последующие 14-20 дней клетки продолжали делиться, менять морфологию, становясь более округлыми и формируя плотные колонии. В этот период времени мы производили механический перенос образовавшихся колоний на соответствующие матриксы (фидер или Matrigel) для дальнейшего культивирования. Ввиду ограниченного количества МК, взятых в репрограммирование, а также общей низкой эффективности репрограммирования МК к плюрипотентному состоянию, было получено только две первичных линии, культивируемых в условиях xeno-free на Matrigel в среде с химически определенным составом, и 11 линий, растущих на слое фидера. Хотя популяция МК состоит преимущественно из лимфоцитов, предполагают, что успех репрограммирования МК зависит, в первую очередь от количества циркулирующих в периферической крови CD34⁺ стволовых клеток крови (Mask et al., 2011). Вероятно, низкая эффективность репрограммирования связана именно с небольшим количеством CD34⁺ клеток в конкретном образце, что может быть объяснено возрастом пациента.

Клетки полученных линий ИПСК отличались характерной для плюрипотентных клеток высокой скоростью пролиферации, большим ядерно-цитоплазматическим соотношением и морфологией колоний, схожей с морфологией ЭСК. Кроме того, клетки экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу – неспецифический маркер плюрипотентных клеток (Рисунок 12а).

Среди полученных линий мы отобрали одну, субъективно отличавшуюся наиболее правильной морфологией, для детальной характеристики с последующим использованием в экспериментах (iALS). Все описанные ниже результаты по исследованию плюрипотентного статуса ИПСК были получены на этой линии.

ИПСК демонстрировали наличие экспрессии ключевых маркеров плюрипотентных клеток (Рисунок 12б-в), обладали нормальным кариотипом (Рисунок 12г) и были способны давать производные трех зародышевых листков *in vitro* (Рисунок 12д).

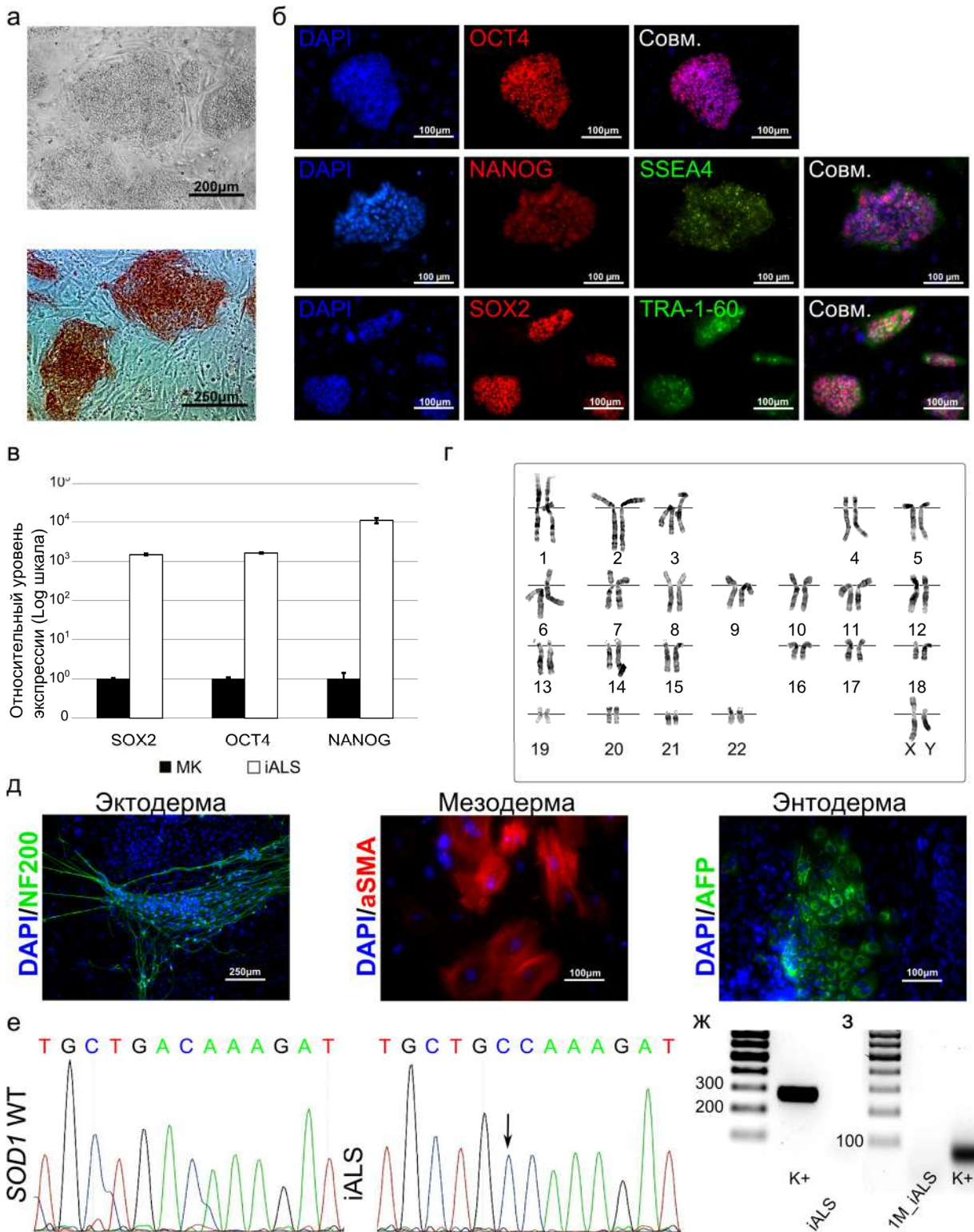


Рисунок 12. Характеристика полученных пациент-специфичных линий ИПСК. а – морфология колоний ИПСК и экспрессия эндогенной щелочной фосфатазы; б – иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов SOX2, OCT4, NANOG и поверхностным антигенам SSEA4 и TRA-1-60. Совм. – совмещение, ядра окрашены DAPI; в – 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); г - кариотип линии iALS; д – Иммунофлуоресцентное

окрашивание, демонстрирующее экспрессию маркеров производных трех зародышевых листков: энтодермы (AFP – альфа-фетопротеин), мезодермы (αSMA – гладкомышечный актин), эктодермы (NF200 – нейрофиламент 200) после спонтанной дифференцировки *in vitro*. Ядра окрашены DAPI; е – Секвеннограмма участка экзона 4 гена *SOD1* в здоровых клетках (*SOD1* WT) и полученных ИПСК (iALS), подтверждающая наличие однонуклеотидной замены в ИПСК; ж – Электрофорез продуктов ПЦР-амплификации участка гена, кодирующего РНК 16s субъединицы рибосом микоплазмы. К+ - положительный контроль; з – Электрофорез продуктов ПЦР-амплификации общего участка эписомных векторов. К+ - положительный контроль.

В полученных линиях ИПСК воспроизводятся генетические особенности донора: сохраняется гомозиготная однонуклеотидная замена в 4 экзоне гена *SOD1* (Рисунок 12е). Также было подтверждено отсутствие встройки эписомных векторов, использовавшихся для репрограммирования (Рисунок 12ж), и контаминации микоплазмой (Рисунок 12з).

В целом, полученные ИПСК соответствуют всем необходимым стандартам качества, что позволило включить их в европейский регистр линий стволовых клеток Human Pluripotent Stem Cell Registry (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi014-A>).

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

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 в этих линиях находятся под управлением системы Tet-On, которая позволяет индуцировать экспрессию желаемых генов путем добавления в среду тетрациклина или его дериватов (например, доксициклин). Для функционирования данной системы необходима встройка как последовательности интересующего гена, которому предшествует TRE (TET-responsive element) в сочетании с минимальным промотором CMV, так и специфического трансаktиватора, который, при добавлении доксициклина, активизирует транскрипцию с TRE-промотора (Das et al., 2016).

Для встройки последовательности трансаktиватора для доксициклин-управляемой экспрессии была использована донорная плазмида *AAVS1*-Neo-M2rtTA (Addgene № 60843), которая содержит плечи гомологии к локусу *AAVS1*,

последовательность трансактиватора и ген устойчивости к неомицину для отбора клонов с целевой встройкой. Плазмиды для встройки последовательностей биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 (pCyto-roGFP2-Orp1 и pMito-roGFP2-Orp1, соответственно) также содержали плечи гомологии к локусу *AAVS1*, последовательность биосенсора и ген устойчивости к пурамицину для отбора клонов, содержащих встройку (Приложение 3).

Отдельно стоит отметить, что гены устойчивости к антибиотикам не имеют собственных промоторов. Это обусловлено особенностью положения локуса *AAVS1*, который находится в интроне активно транскрибирующегося гена *MBS85*, кодирующего ингибирующую субъединицу 12С протеинфосфатазы 1. При встраивании в *AAVS1*, ген устойчивости попадает под управление промотора *MBS85* и обеспечивает клеткам резистентность к антибиотику. Поскольку вероятность попасть под управление какого-либо другого промотора в случае нецелевой интеграции донорной плазмиды в геном крайне мала, селекцию на антибиотике переживают преимущественно клетки, в которых встройка донорной последовательности произошла именно в *AAVS1*.

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. Среди клонов, устойчивых к содержанию в селективной среде были отобраны те, которые реагируют возникновением GFP сигнала в ответ на добавление доксициклина в среду (Рисунок 13а, 13б).

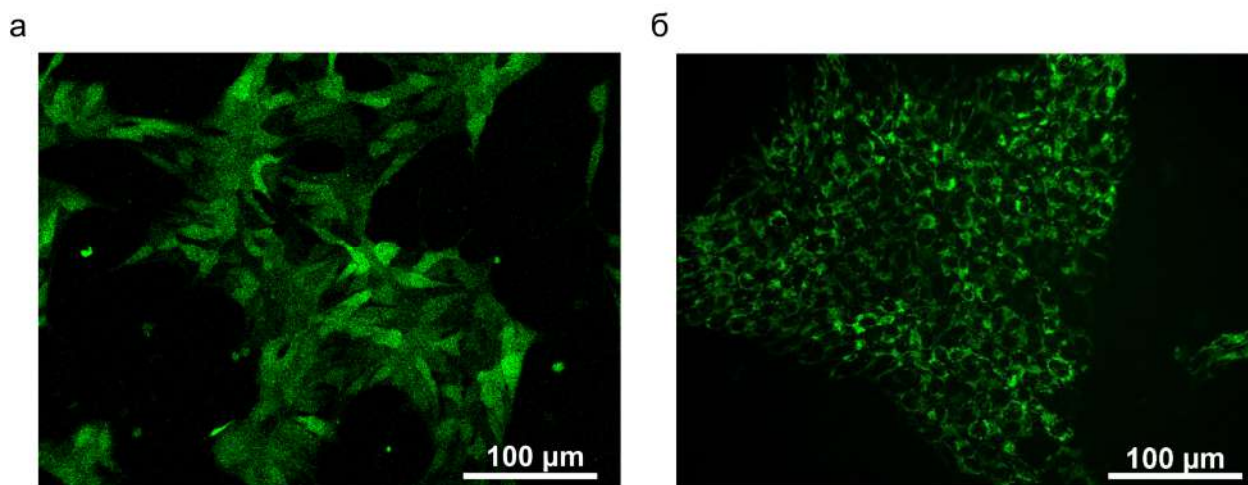


Рисунок 13. Флуоресценция roGFP2 в трансгенных ИПСК линии K7-4. а – флуоресценция roGFP2 сенсора Cyto-roGFP2-Orp1; б – флуоресценция roGFP2

сенсора Mito-roGFP2-Orp1. Снимок сделан на микроскопе Nikon Eclipse Ti2. Увеличение 20х

Используя ПЦР (Рисунок 14а), мы провели скрининг клонов на предмет наличия обеих встроек в локус *AAVS1* (Рисунок 14б).

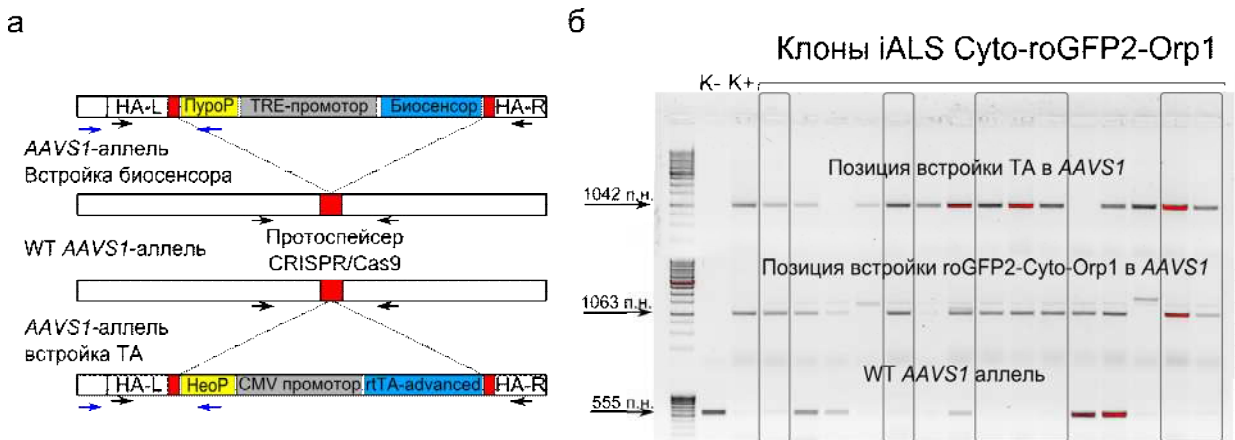


Рисунок 14. а – структура локуса *AAVS1* после встройки трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии и последовательности биосенсора. Показано, что система для доксициклин-управляемой экспрессии биосенсоров располагается в локусах *AAVS1* на обеих гомологичных хромосомах. Стрелки черного цвета – праймеры для ПЦР-амплификации продукта дикого типа *AAVS1*; стрелки синего цвета – праймеры для ПЦР-амплификации фрагмента встройки и локуса *AAVS1* для подтверждения корректности позиции встраивания; TRE-промотор – промотор, активируемый трансактиватором rtTA; PuroR – ген устойчивости к пурамицину; NeoR – ген устойчивости к неомицину, rtTA-advanced – вариант трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии. б – Пример электрофореза продуктов ПЦР-амплификации с геномной ДНК клонов ИПСК, устойчивых к присутствию неомицина и пурамицина в среде. Верхний ряд – участок локуса *AAVS1* со встроеной последовательностью трансактиватора; средний ряд – участок локуса *AAVS1* со встроеной последовательностью биосенсора (средний ряд); Нижний ряд – участок локуса *AAVS1* дикого типа. Стрелками обозначен размер целевого продукта; К- – геномная ДНК линии ИПСК iALS; К+ – геномная ДНК линии ИПСК GRX5. Клоны, отвечающие требованиям исследования, отмечены рамками.

Известно, что плазмиды имеют тенденцию к случайной интеграции в геном, что нежелательно, так как эффект такой интеграции непредсказуем. Для поиска клонов, у которых отсутствуют дополнительные встройки плазмиды, мы применили метод ПЦР. Известно, что лишь часть донорной плазмиды, заключенная между плечами гомологии, должна интегрироваться в геном, если имеют место только целевые события. Следовательно, спустя определенное время после трансфекции, будет невозможно детектировать те фрагменты плазмиды, которые не должны встраиваться в геном. При трансфекции было использовано по 5 мкг (около 1 пмоль) каждого донора на $1 \cdot 10^6$ клеток. При условии, что все копии

плазмиды попадают внутрь клетки при электропорации, и, учитывая размеры плазмиды (усредним до 9 т.п.н.), получается, что на одну клетку приходится $(1 * 10^{-12} \text{ моль} * 6,022 * 10^{23}) / (1 * 10^6) = 6 * 10^5$ копий каждой плазмиды (<https://nebiocalculator.neb.com/>). Но, поскольку в условиях эксперимента невозможно определить реальную долю плазмид, которые проникли внутрь клетки, в представленных далее расчетах мы допускаем, что все плазмиды были доставлены. Если принять, что при каждом делении количество плазмиды уменьшается в 2 раза, то полная ее элиминация произойдет не позднее, чем через $\log_2(6 * 10^5) = 19,19 \rightarrow 20$ делений клетки, или через ~2 недели культивирования (Wadkin et al., 2017).

Для ПЦР-анализа на присутствие дополнительной интеграции плазмиды праймеры были подобраны, так, что один лежал на той части плазмиды, которая должна быть интегрирована в геном, а другой, на невстраивающейся части плазмиды. В случае дополнительных нецелевых встроек плазмиды в геном, ПЦР-продукт образуется, если их нет, то ПЦР-продукт отсутствует.

Скрининг на предмет дополнительных интеграций донорных плазмид при помощи ПЦР позволил отобрать клоны, которые с большой долей вероятности их не имеют (Рисунок 15). Конечно, такой метод скрининга 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. Хотя, вероятно, они также могут быть использованы для дополнительной проверки отдельных трансгенных линий при необходимости.

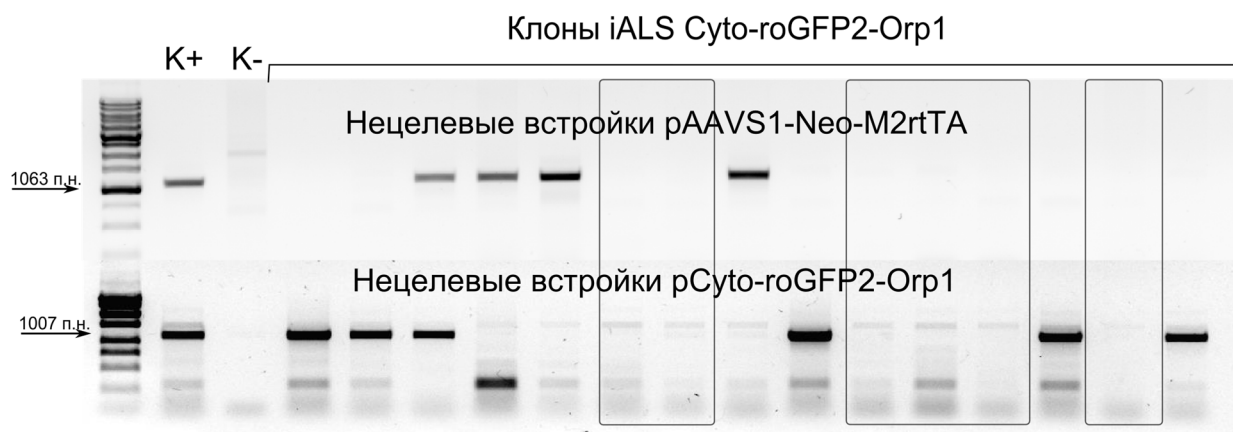


Рисунок 15. Пример электрофореза продуктов ПЦР-амплификации с геномной ДНК клонов ИПСК на предмет нецелевых встроек донорных плазмид.

Верхний ряд – продукт амплификации участка донорной плазмиды pAAVS1-Neo-M2rtTA, находящегося на границе между встраиваемой и невстраиваемой частями плазмиды. Нижний ряд – продукт амплификации участка донорной плазмиды pCyto-roGFP2-Orp1, находящегося на границе между встраиваемой и невстраиваемой частями плазмиды. Стрелками обозначен размер целевого продукта; K- – геномная ДНК линии ИПСК iALS; K+ – ДНК донорных плазмид pAAVS1-Neo-M2rtTA (верхний ряд) и pCyto-roGFP2-Orp1 (нижний ряд). Клоны, отвечающие требованиям исследования, отмечены рамками.

В результате экспериментов по созданию трансгенных линий был получен ряд линий ИПСК: здоровых и мутантных по *SOD1*, содержащих встройки биосенсоров перекиси водорода (Таблица 4). 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.

Таблица 4. Количество трансгенных клонов ИПСК, полученных для каждой линии

Линия ИПСК	Cyto-roGFP2-Orp1	Mito-roGFP2-Orp1
iALS (БАС, пациент-специфичные)	17 клонов (iALS-Cyto)	11 клонов (iALS-Mito)
K7-4 (Здоровый контроль)	5 клонов (K7-4-Cyto)	3 клон (K7-4-Mito)
SOD1-D90A (БАС, изогенные контролю)	14 клонов (D90A-Cyto)	11 клонов (D90A-Mito)
SOD1-G127R (БАС, изогенные контролю)	12 клонов (G127R-Cyto)	12 клонов (G127R-Mito)

3.4 Направленная дифференцировка ИПСК в спинальные моторные нейроны

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. Поэтому, функциональную оценку МН мы проводили на 29-34 дни дифференцировки, когда

клетки уже достаточно зрелые для демонстрации патологического фенотипа (Рисунок 16).

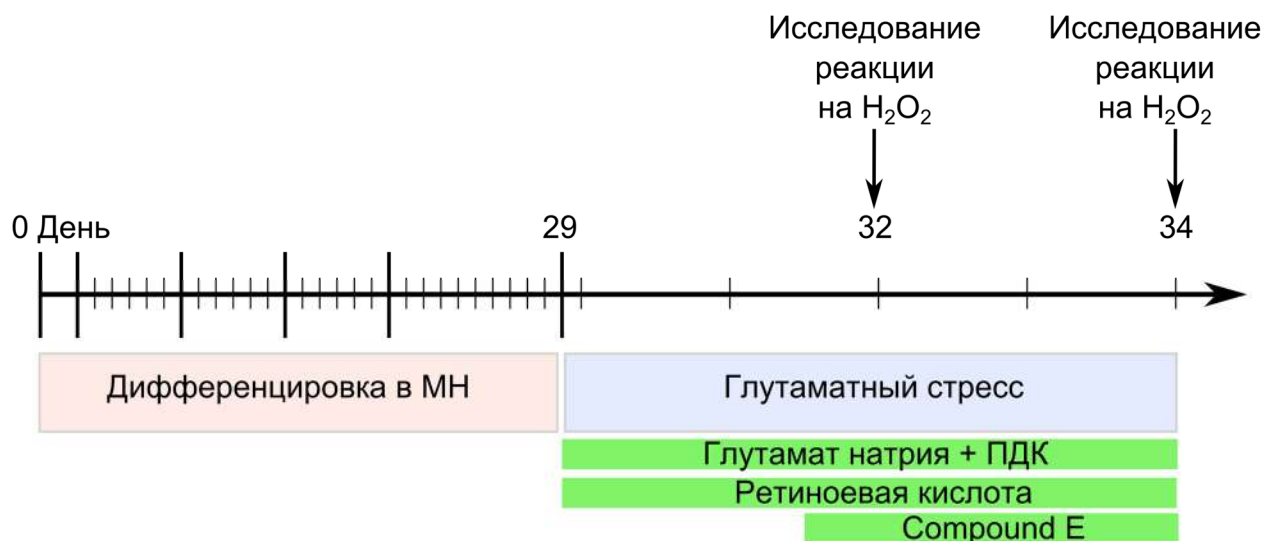


Рисунок 16. Временная шкала проводимых исследований моторных нейронов. Исследование реакции моторных нейронов на H₂O₂ проводилось на 32 и 34 дни дифференцировки. Индукция глутаматного стресса с 29 по 34 дни дифференцировки. ПДК – L-транс-пирролидин-2,4-дикарбоновая кислота.

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

Дифференцировку клеток проводили по протоколу, опубликованному ранее (Du et al., 2015), не прибегая к модификациям на первых этапах (Рисунок 6).

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 (Рисунок 17а). Клоны демонстрировали сопоставимый уровень экспрессии мРНК данных маркеров (Рисунок 17б), а также процент позитивно-окрашенных на ISL1 клеток в культуре (Рисунок 17в), что дает право сравнивать результаты, полученные в экспериментах на этих линиях.

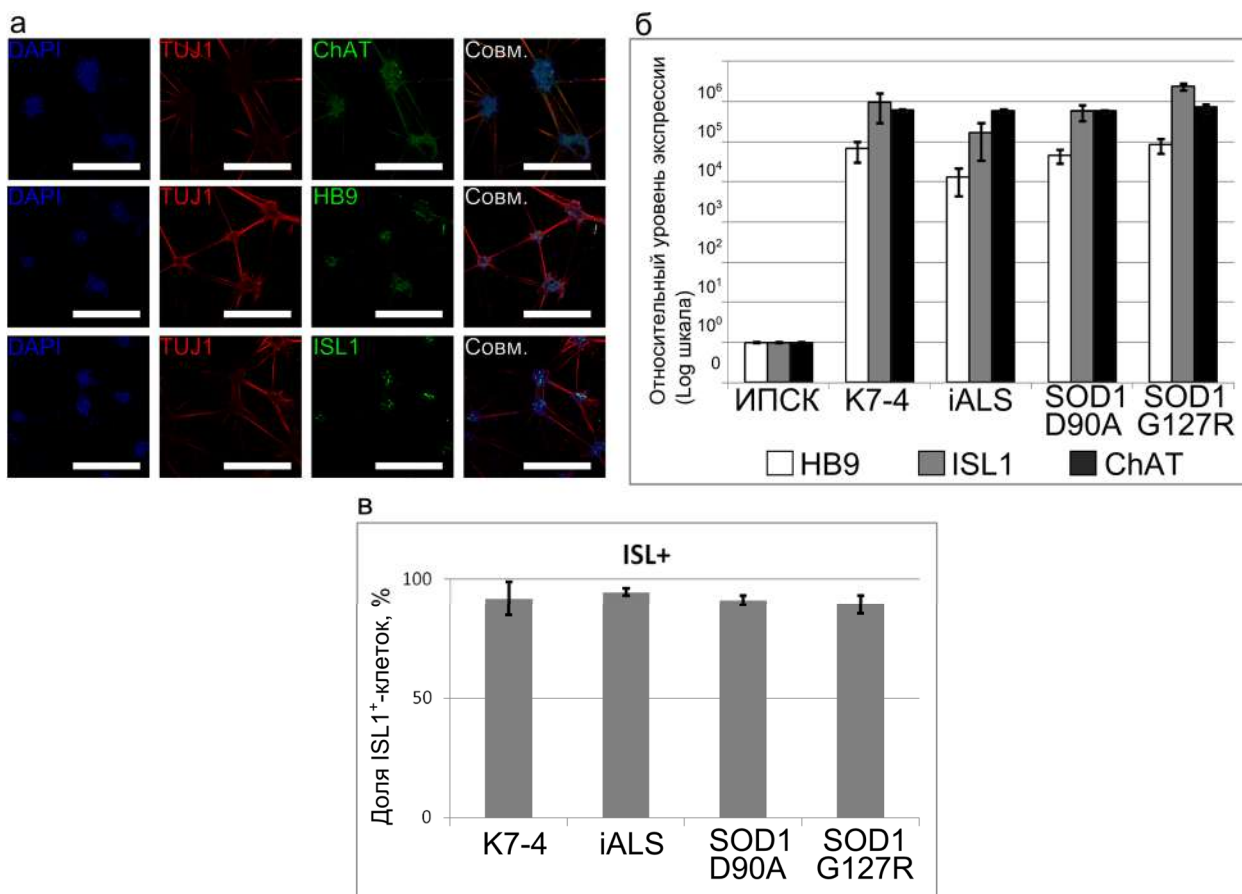


Рисунок 17. Характеристика спинальных моторных нейронов, полученных из разных линий ИПСК. а – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, полученных в результате дифференцировки, на маркеры зрелых моторных нейронов (ChAT, HB9, ISL). Совм. – совмещение, шкала – 300 мкм; б – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов-маркеров зрелых моторных нейронов (*HB9*, *ISL1*, *ChAT*). Значения нормализованы на уровень экспрессии в образце ИПСК (n=6, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение); в – Количественная оценка доли ISL⁺ клеток методом проточной цитометрии (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение). K7-4, iALS, SOD1-D90A и SOD1-G127R – МН соответствующих линий ИПСК

3.4.2 Получение препаратов живых моторных нейронов для лазерной сканирующей микроскопии

Особенно остро в процессе дифференцировки стоит вопрос культивирования МН на финальных этапах. Для этих клеток характерна слабость прикрепления к поверхности культурального пластика, которая сочетается с образованием очень прочных связей между клетками, что повышает риск их открепления. Для того чтобы преодолеть данную проблему, мы модифицировали терминальный этап дифференцировки. Вместо стандартного культивирования МН на поверхности, покрытой Matrigel, мы использовали Matrigel для создания объемной структуры, в

которую помещали МН для созревания. Такой подход позволил закрепить клетки в исходном положении, снизил степень их миграции и обеспечил возможность долгосрочного культивирования МН (Рисунок 18а, 18б). Хотя в данной работе не стояло задачи культивирования клеток в трехмерных условиях, помещение моторных нейронов внутрь матрикса также позволило создать условия, более близкие к естественным, и способствовало образованию нейрональных связей между клетками в трех измерениях.

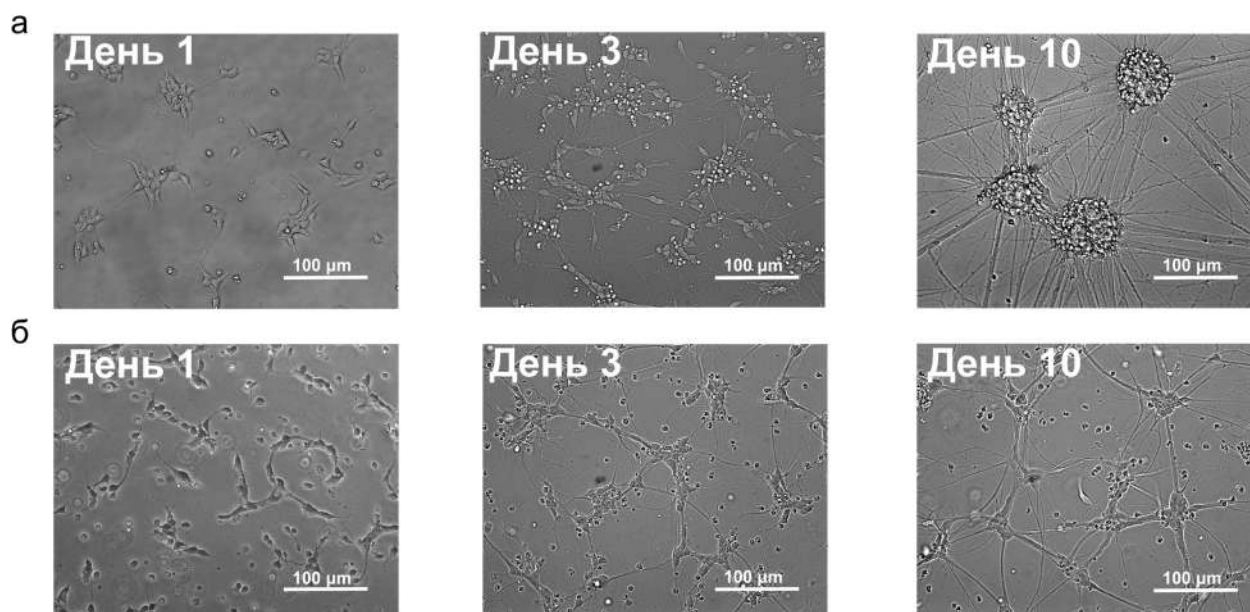


Рисунок 18. Изменение морфологии спинальных моторных нейронов в процессе созревания (день 1, 3 и 10, или 20, 22 и 29 дни дифференцировки, соответственно) в зависимости от способа культивирования на терминальном этапе дифференцировки. а – культивирование на поверхности, покрытой Matrigel; б – культивирование в слое Matrigel.

3.4.3 Изменение экспрессии биосенсора в ходе дифференцировки в спинальные моторные нейроны

Дополнительно, в ходе получения моторных нейронов, было обнаружено, что не всегда клетки сохраняют экспрессию биосенсора к моменту окончания протокола дифференцировки, причем, это явление не зависело от клона, из которого нейроны были получены (Рисунок 19а).

Поиск информации в литературе показал, что локус *AAVS1* может подвергаться гетерохроматинизации с затуханием экспрессии трансгенов, встроенных в него (Klatt et al., 2020; Ordovás et al., 2015). Анализ собственных действий, которые приводили к сохранению экспрессии биосенсора на

терминальных этапах дифференцировки, привел к гипотезе, что именно поддержание активного состояния промотора биосенсора способствует сохранению интенсивности флуоресцентного сигнала.

Анализ экспрессии РНК трансгенов показал, что экспрессия трансактиватора, 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 19б).

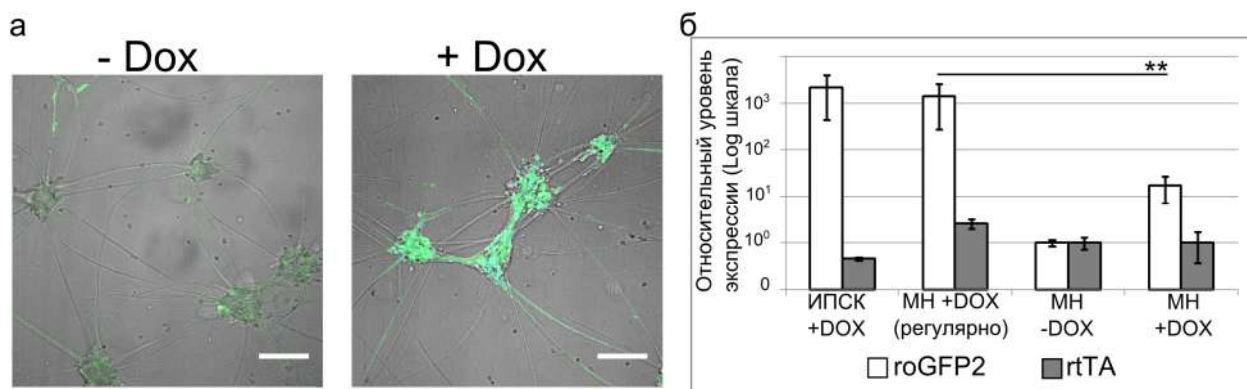


Рисунок 19. Изменение экспрессии биосенсора roGFP2-Cyto-Ogr1 в ходе дифференцировки ИПСК в спинальные моторные нейроны. а - интенсивность флуоресценции биосенсора на основе roGFP2 при индукции доксициклином в терминально дифференцированных спинальных моторных нейронах. Слева – дифференцировка в отсутствие доксициклина в культуральной среде (-Dox), справа – дифференцировка в условиях регулярного добавления доксициклина в среду (+Dox). Шкала 100 мкм; б – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции трансгенов: трансактиватора для доксициклин-зависимой экспрессии (rtTA) и биосенсора (roGFP2). Значения нормализованы на уровень экспрессии в образце моторных нейронов, не подвергавшихся действию доксициклина (n=6, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение). ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, МН – моторные нейроны.

3.4.4 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 20). 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 моторных нейронов линии SOD1-G127R по сравнению с контрольными МН K7-4 и МН iALS и SOD1-D90A, что, вероятно, отражает более агрессивный характер мутации.

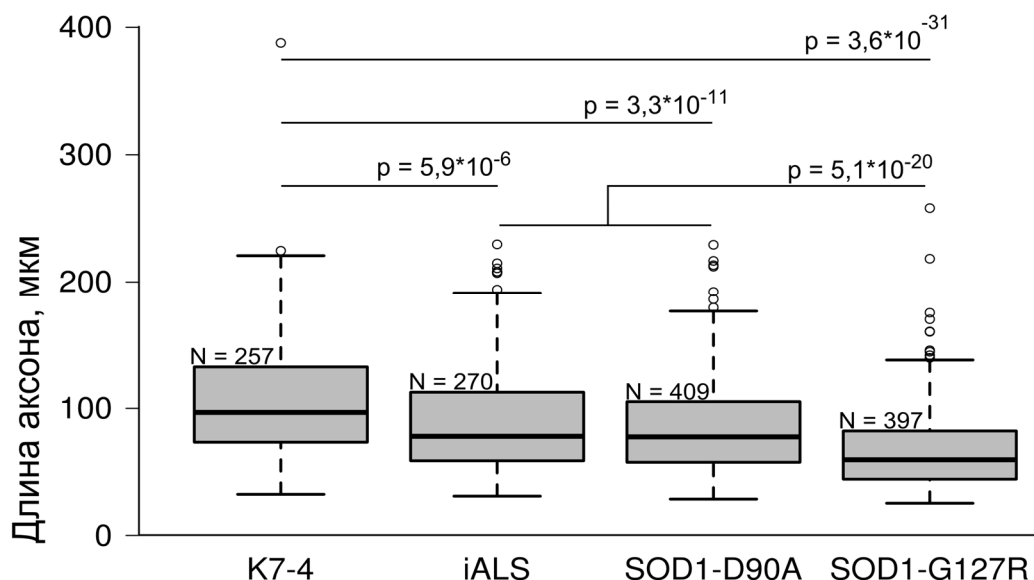


Рисунок 20. Количественная оценка длины аксонов МН на 21 день дифференцировки. Продемонстрировано уменьшение длины отростков клеток с мутациями в гене *SOD1* по сравнению с контролем, а также более выраженное уменьшение длины отростков МН линии SOD1-G127R по сравнению с МН SOD1-D90A и iALS. Данные представлены 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.

3.5 Функциональная характеристика биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1

3.5.1 Подтверждение функциональности биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1. 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 (GFPox) имеет максимум возбуждения на длине волны – 400 нм, восстановленный (GFPred) – 490 нм, при сохранении максимума эмиссии в диапазоне 500-530 нм. Таким образом, возбуждая клетки поочередно UV-лазером (405 нм) и аргоновым лазером (488 нм), можно получать информацию от каждой из форм roGFP2 в виде сигнала, интенсивность которого может быть измерена. Отношение интенсивностей GFPox и GFPred 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.

Основное преимущество в использовании генетически-кодируемых биосенсоров перекиси водорода – возможность наблюдения за изменением ее уровня во времени. Тем не менее, необходимо удостовериться, что динамический диапазон биосенсоров, то есть разница между максимально окисленным и максимально восстановленным состоянием выражается в значительном изменении интенсивности сигналов. Чем шире диапазон, тем чувствительнее биосенсор к небольшим изменениям в концентрации перекиси водорода, и тем больше вероятность уловить патологические отклонения.

По литературным данным, динамический диапазон биосенсоров перекиси водорода варьирует в пределах от 3 до 8 (Morgan et al., 2011; Panieri et al., 2017). То есть отношение интенсивностей GFPox/GFPred в максимально окисленном состоянии в 3-8 раз больше, чем соотношение в максимально восстановленном

состоянии. 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 одной копии, 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. За процессом окисления/восстановления мы наблюдали в реальном времени путем серийной съемки через каждые 90 секунд. В результате обработки изображений мы получили 2 типа кривых для обоих сенсоров: кривую окисления и кривую восстановления (Рисунок 21а).

Динамический диапазон для сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 по результатам расчетов, колебался от 3,5 до 4,3 для разных линий и составлял, в среднем, $4 \pm 0,33$, что сопоставимо с данными, описанным другими исследователями (Panieri et al., 2017). Для Mito-roGFP2-Orp1 значение динамического диапазона оказалось чуть меньше, около $3,3 \pm 0,61$, однако, отличия между Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 не были значимыми (Рисунок 21б). 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.

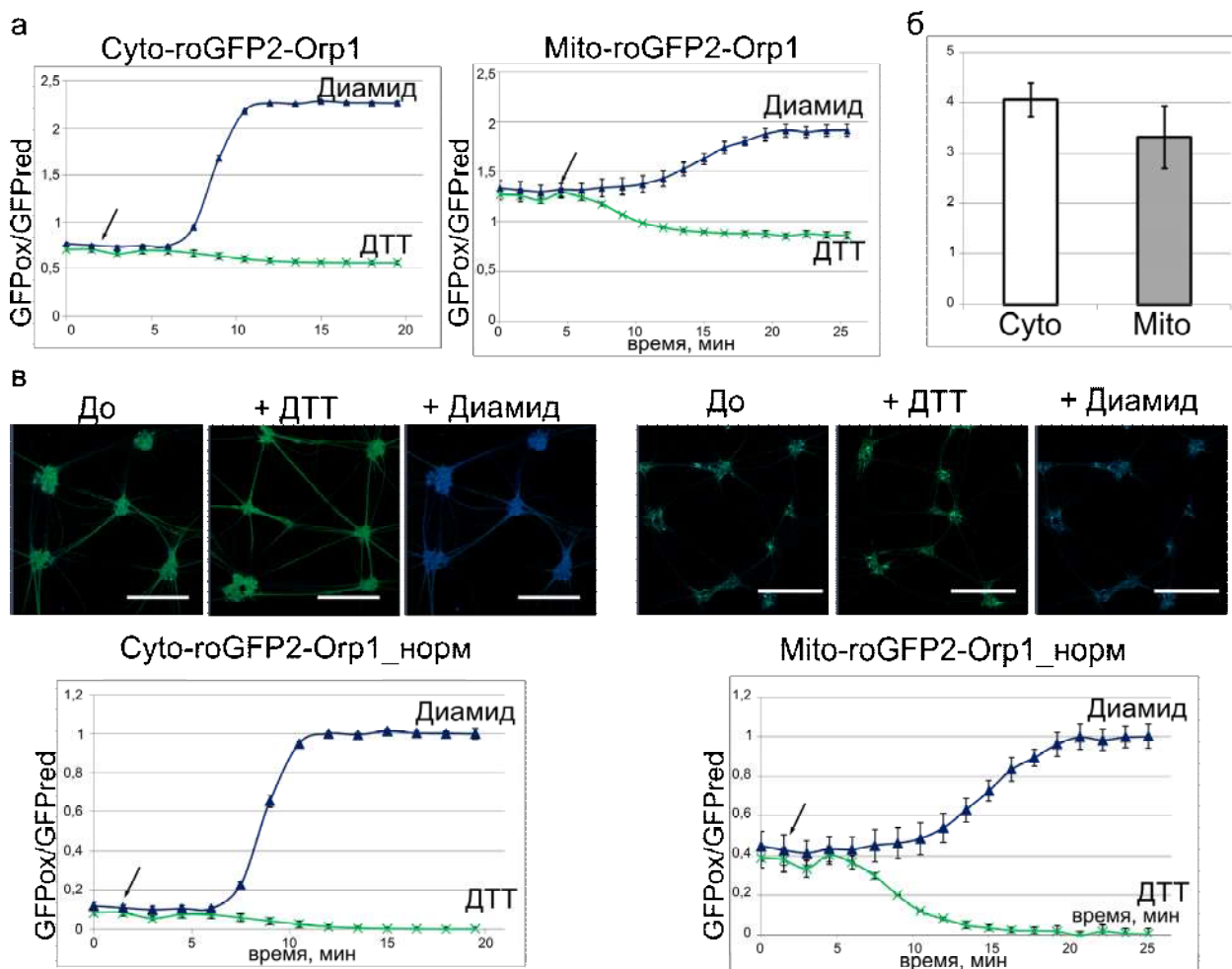


Рисунок 21. Реакция биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 на добавление ДТТ и Диамида (на примере линии iALS-Cyto и iALS-Mito, соответственно). а - Графики изменения соотношения GFPox/GFPred для биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 (слева) и Myto-roGFP2-Orp1 (справа) в реальном времени после добавления ДТТ/Диамида (показано стрелкой); б – средний динамический диапазон сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 (Cyto) и Mito-roGFP2-Orp1 (Mito) для моторных нейронов, использованных в работе (n=4, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение); в - Совмещенные изображения окисленного и восстановленного Cyto-roGFP2-Orp1 (слева) и Myto-roGFP2-Orp1 (справа) до и после добавления ДТТ/Диамид (Шкала – 200 мкм). Под изображениями, нормализованные графики изменения соотношения GFPox/GFPred для биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 (слева) и Myto-roGFP2-Orp1 (справа) в реальном времени после добавления ДТТ/Диамида (показано стрелкой).

При калибровке в МН также было отмечено, что, в целом, сенсор Cyto-roGFP2-Orp1 относительно слабо реагирует на восстановление и сильно на окисление, в то время как для сенсора Mito-roGFP2-Orp1 графики окисления и восстановления отличаются только направлением роста (Рисунок 21а, 21в, Рисунок 22а-з). Если нормализовать полученные для каждой линии значения от 0 до 1, где 0

– максимально восстановленное состояние, а 1 – максимально окисленное, то получается, что в митохондриях МН исходный уровень H_2O_2 , в среднем, в 4 раза выше, чем в цитоплазме (Рисунок 23а).

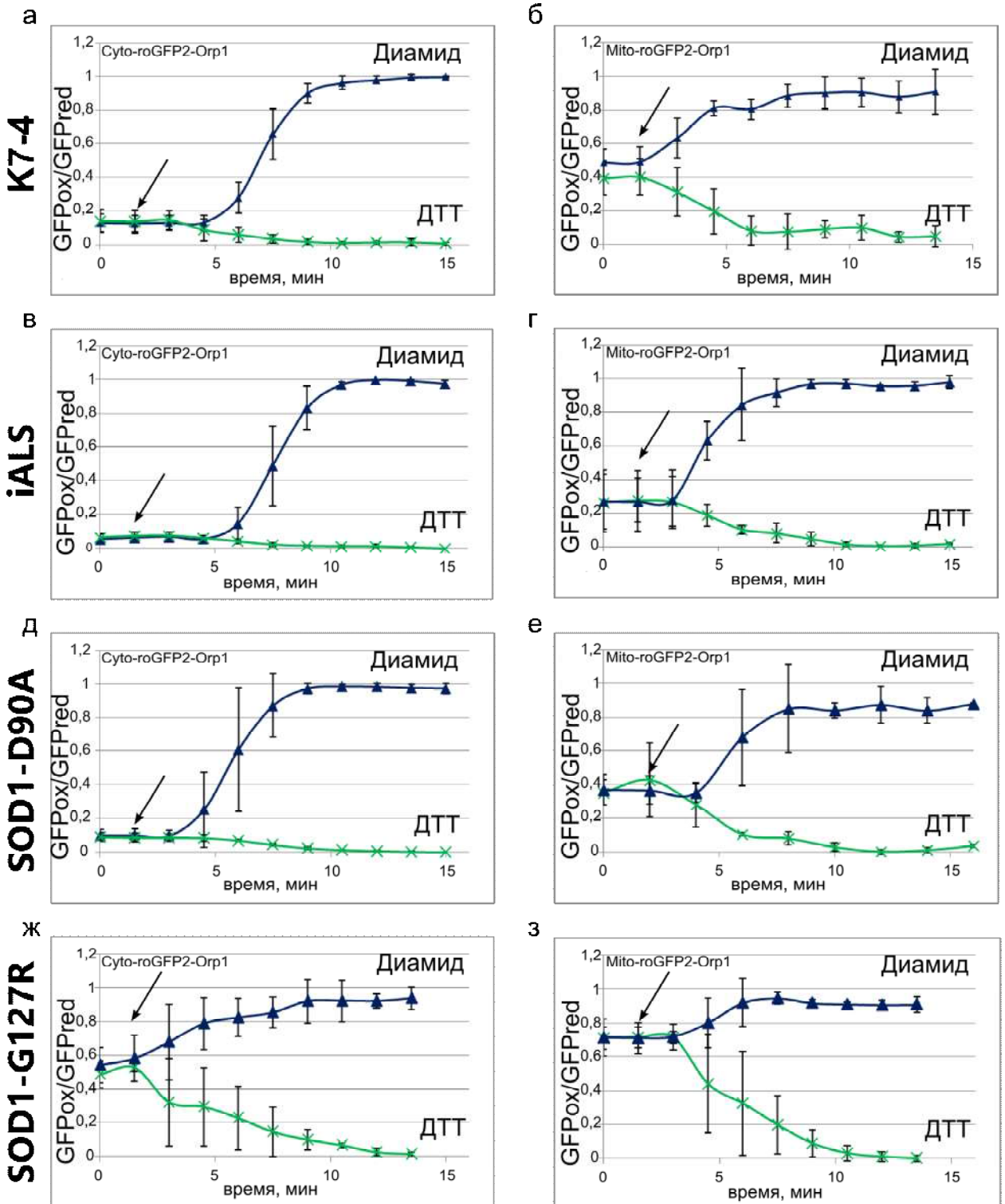


Рисунок 22. Нормализованные графики изменения соотношения GFPox/GFPred в биосенсорах Cyto-roGFP2-Orp1 (слева) и Mito-roGFP2-Orp1 (справа) под действием ДТТ и Диамида в реальном времени для использованных в работе линий. а, б – моторные нейроны линии K7-4; в, г – моторные нейроны линии iALS; д, е – моторные нейроны линии SOD1-D90A; ж, з – моторные нейроны линии SOD1-

G127R ($n=3$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение). По оси абсцисс отмечено время в минутах, по оси ординат – ненормализованное соотношение интенсивностей GFPox/GFPred. Стрелкой отмечен момент добавления ДТТ/Диамид.

Полученное значение сигнала биосенсора в самом начале временной серии отражает базовый уровень H_2O_2 и исходное состояние клеток на момент начала исследования. Сравнение сигналов сенсоров в МН, на которых был проведен эксперимент, на момент начала наблюдений, позволило выявить значимое увеличение уровня перекиси водорода в клетках линии SOD1-G127R, как в цитоплазме, так и в митохондриях (Рисунок 23а), что, вероятно, является следствием данной мутации.

Поскольку, для динамических тестов клетки подвергаются процедуре «голодания»: замене среды на питательно обедненную за сутки до эксперимента, что, само по себе, вызывает стресс, мы решили проверить, демонстрируют ли МН эквивалентной степени зрелости (29 день дифференцировки) такие же показатели в уровне перекиси водорода, находясь в полноценной среде для МН, содержащей большое количество питательных веществ. Полученные значения оказались ниже тех, что наблюдали в клетках, подвергшихся голоданию (Рисунок 23б). Кроме того, исчезала разница в уровне цитоплазматической и митохондриальной H_2O_2 для МН линий K7-4, iALS и SOD1-D90A. Тем не менее, МН линии SOD1-G127R также демонстрировали повышение уровня цитоплазматической и митохондриальной H_2O_2 относительно контрольных образцов. Причем, добавление трофических факторов в культуральную среду значимо снижало уровень окисления сенсора Cyto-roGFP2-Orp1, но не сенсора Mito-roGFP2-Orp1 (Рисунок 23в). Измерение уровня окисления сенсоров на 32 день дифференцировки позволило выявить еще более выраженные изменения в уровне перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях нейронов линии SOD1-G127R (Рисунок 23г). Присутствие трофических факторов также незначительно снижало степень окисления сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 и не влияло на Mito-roGFP2-Orp1 (Рисунок 23д). Помимо этого, нейроны демонстрировали видимые морфологические признаки дегенерации в виде фрагментации аксонов (Рисунок 23е).

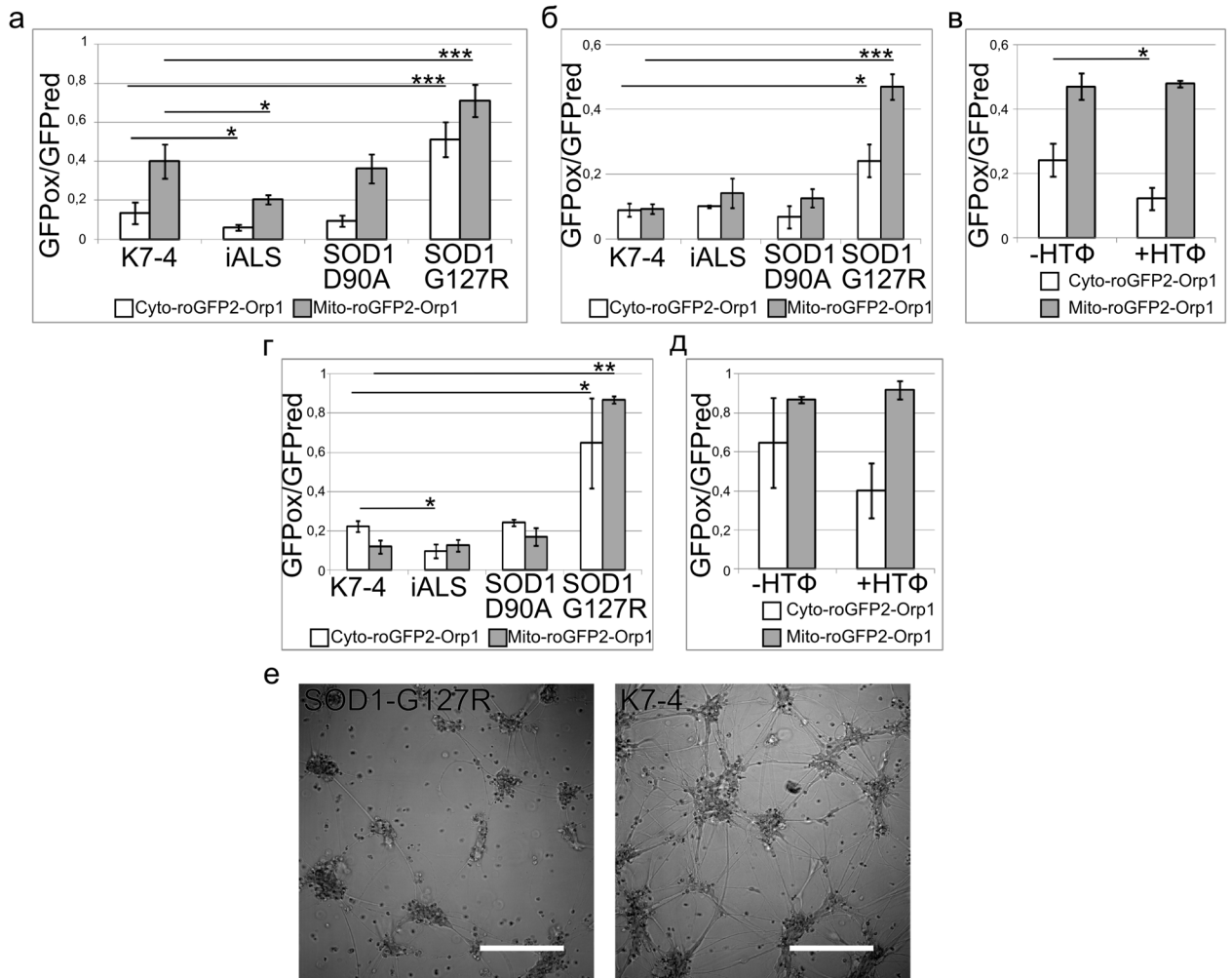


Рисунок 23. Влияние генотипа МН на степень окисления сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 и морфологию клеток. а – степень окисления сенсоров в МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на 29 день дифференцировки (предварительная депривация питательных веществ на 24 часа); б, г - степень окисления сенсоров в МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на 29 и 32 дни дифференцировки, соответственно (стандартная среда для культивирования); в, д - степень окисления сенсоров в МН линий SOD1-G127R на 29 и 32 дни дифференцировки, соответственно, в зависимости от присутствия нейротрофических факторов (НТФ) в среде; е – 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), * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$.

3.5.2 Реакция биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 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 отреагируют 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 GFP_{Pox}/GFP_{Pred} в течение полутора часов после добавления перекиси водорода.

Первые эксперименты по исследованию реакции МН (на примере сенсора Cyto-roGFP2-Orp1) показали: соотношение roGFP_{Pox}/roGFP_{Pred} увеличивается в ответ на добавление H_2O_2 (Рисунок 24а). Тем не менее, общая форма графика была неудовлетворительной – в фазе окисления значение менялось значительно медленнее и слабо, чем это описывалось ранее для данного сенсора. Мы предположили, что препятствием на пути к нормальной реакции служит стандартная добавка для культивирования нейрональных клеток (B-27), содержащая также компоненты для защиты от активных форм кислорода: супероксиддисмутазу, каталазу, глутатион, витамин Е и ацетат витамина Е. Чтобы устранить ее действие, мы заменили среду на дефицитную, не содержащую данной добавки, за день до съемки. В результате, форма графика изменилась: фаза окисления приобрела экспоненциальный вид, увеличилась дельта максимального изменения соотношения roGFP_{Pox}/roGFP_{Pred}, но при этом возросла и скорость восстановления клеток (Рисунок 24б, 24в).

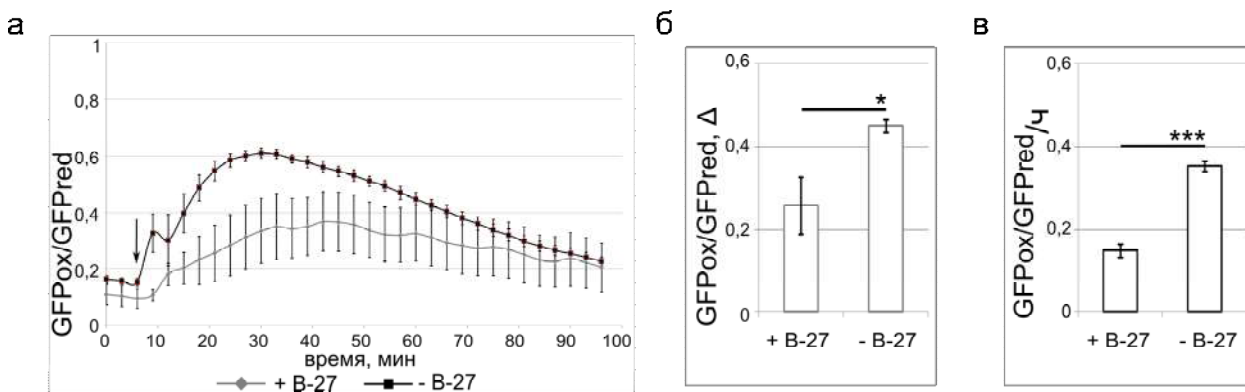


Рисунок 24. Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 в зависимости от условий культивирования. а – график изменения в реальном времени соотношения GFP_{Pox}/GFP_{Pred} биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 ; б – дельта максимального изменения соотношения GFP_{Pox}/GFP_{Pred} после добавления H_2O_2 (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего); в - значение скорости восстановления клеток после добавления H_2O_2 . Скорость обозначена, как изменение соотношения GFP_{Pox}/GFP_{Pred} за 1 час (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего). + B-27 –

нейроны, культивированные в стандартной среде для дифференцировки, содержащей добавку В-27. – В-27 – нейроны, в которых была произведена смена среды на дефицитную за день до эксперимента. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,0005$.

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 25а).

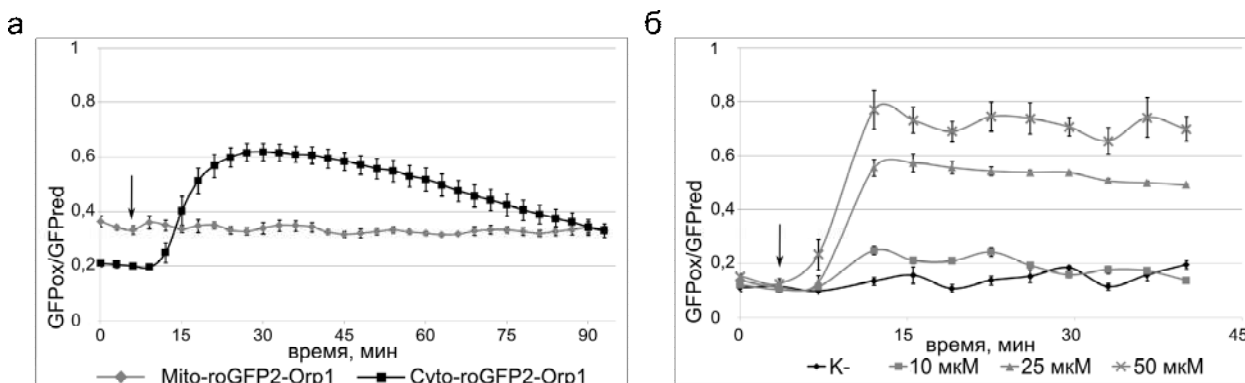


Рисунок 25. Реакция биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 . а – график изменения соотношения GFPox/GFPred биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 ; б – график изменения соотношения GFPox/GFPred биосенсора Mito-roGFP2-Orp1 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 моторных нейронах 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).

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 24а). 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 25б).

В целом, реакция на добавление перекиси оказалась одинаковой для контрольных МН линии K7-4 и для МН iALS и SOD1-D90A (Рисунок 26а, Приложение №4). Дельты максимального изменения сигнала сенсора, а также скорости восстановления клеток не отличались (Рисунок 26б, 26в).

Отличия возникли только для МН линии SOD1-G127R: исходный уровень окисления нейронов был крайне высок и добавление перекиси водорода 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 исходной степени окисления сенсора, однако не влияло на реакцию клеток на H_2O_2 : МН демонстрировали незначительное окисление сенсора, которое, однако, не сменялось восстановлением, как это происходило в случае МН других линий (Рисунок 26г).

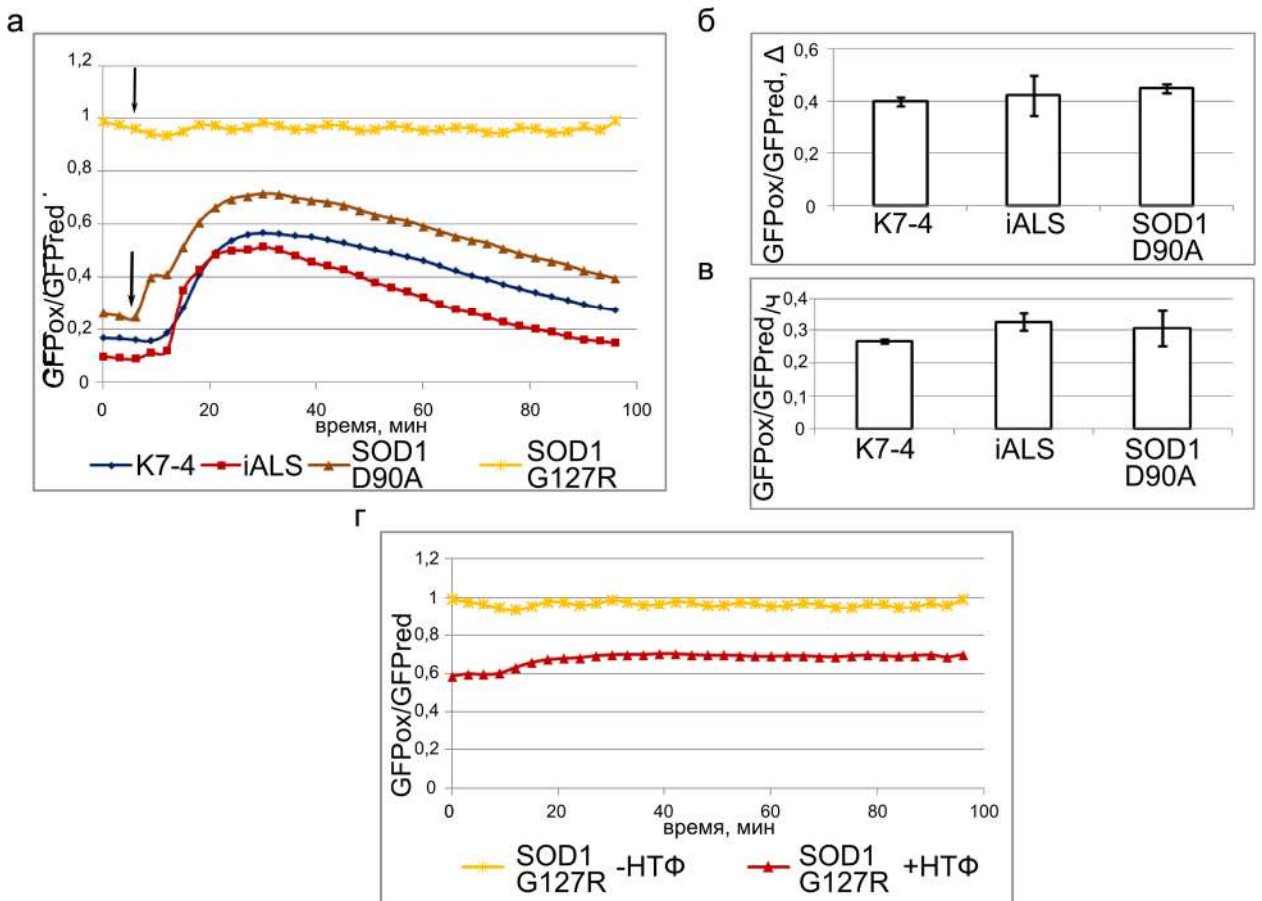


Рисунок 26. Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 моторных нейронов линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 . а – график изменения соотношения GFPox/GFPred в реальном времени после добавления H_2O_2 (обозначено стрелкой); б – дельта максимального изменения соотношения 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 моторным нейронам линии SOD1-G127R, культивируемым в стандартных условиях (оранжевый график), и в присутствии трофических факторов (красный график). Значения графиков реакции биосенсора получены в результате усреднения результатов трех независимых биологических повторов, графики со стандартными отклонениями показаны в Приложении №4.

3.5.3 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 в течение 5 суток, 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 моторных нейронов, полученных из ИПСК здорового контроля, пациент-специфичных ИПСК 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 27а). Для сенсора Mito-roGFP2-Orp1 не удалось увидеть такой же закономерности, несмотря

на то, что дисфункция митохондрий напрямую связана с эксайтотоксичностью (Рисунок 27б). 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 27в). При сравнении соотношения показателей сигнала сенсора в зависимости от присутствия/отсутствия глутамата в среде на 5 сутки также не удалось выявить достоверных отличий между контрольными моторными нейронами K7-4 и моторными нейронами с мутацией D90A (iALS и SOD1-D90A) (Рисунок 27г).

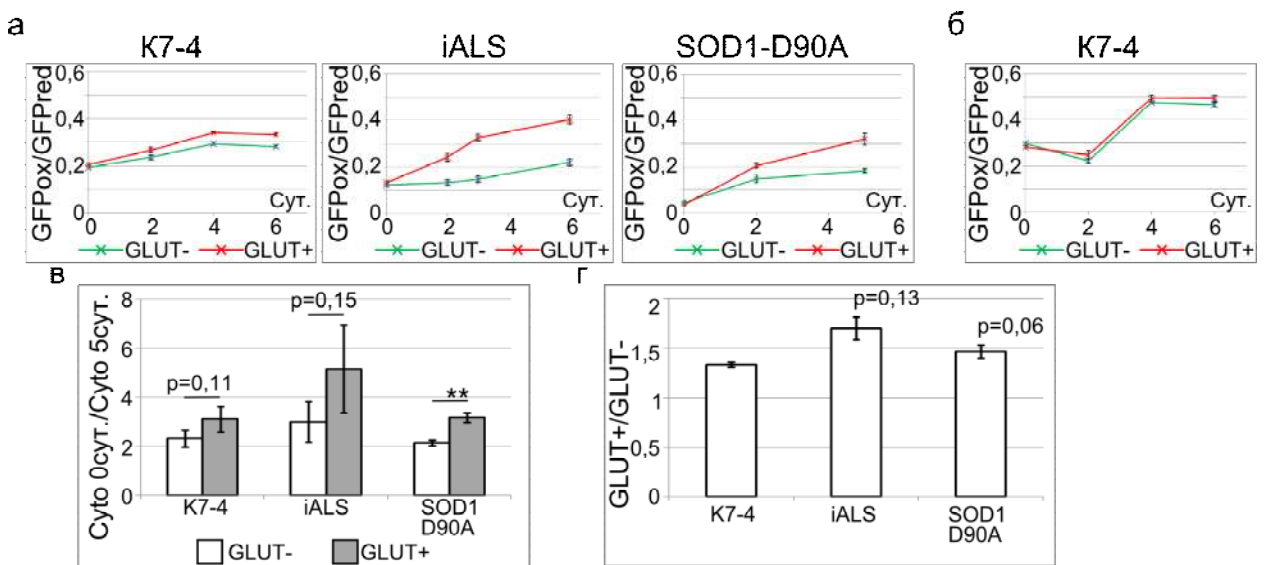


Рисунок 27. Реакция спинальных моторных нейронов линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R на добавление глутамата натрия+ПДК в культуральную среду. а – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 по дням в течение 5-6 суток культивирования МН с глутаматом натрия+ПДК (график красного цвета) и без глутамата натрия+ПДК (график зеленого цвета), (n=5, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего); б – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Mito-roGFP2-Orp1 по дням в течение 6 суток культивирования МН с глутаматом натрия+ПДК (график красного цвета) и без глутамата натрия+ПДК (график зеленого цвета), (n=5, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего); в – изменение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в зависимости от присутствия/отсутствия глутамата натрия+ПДК в среде на 5 сутки (нормализованы на значения GFPox/GFPred, зафиксированные на 0 сутки. N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего); г – увеличение соотношения GFPox/GFPred биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в присутствии глутамата натрия+ПДК (нормализованы на значения GFPox/GFPred в МН, культивировавшихся без глутамата натрия+ПДК. N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm 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 H_2O_2 в культуральную среду по окончании 5 суток культивирования моторных нейронов в среде, содержащей глутамат натрия. В результате мы получили 2 графика реакции для каждого типа моторных нейронов: тех, которые подвергались хроническому глутаматному стрессу и тех, которые культивировались то же время, но в стандартных условиях (Рисунок 28а-в).

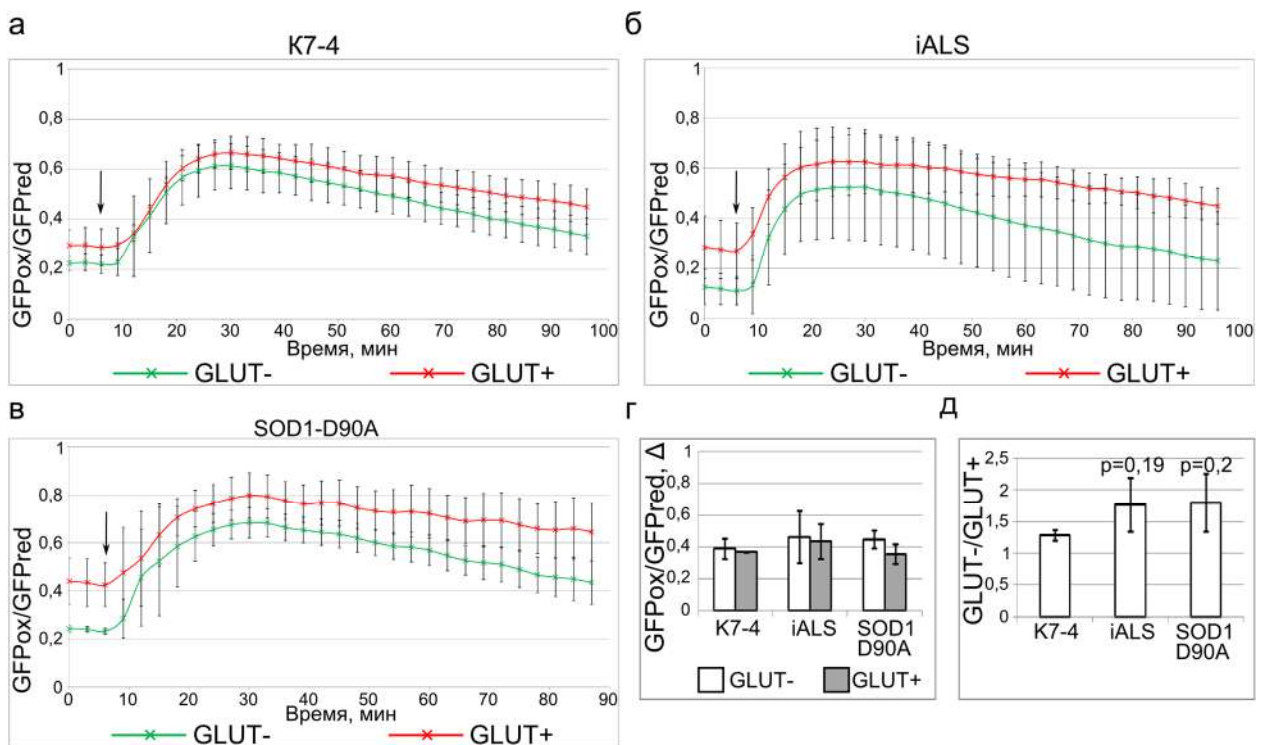


Рисунок 28. Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в МН линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 μM H_2O_2 после 5 суток культивирования в среде, содержащей глутамат натрия+ПДК. а-в – графики изменения соотношения GFPox/GFPred в МН линий K7-4, iALS и SOD1-D90A, соответственно, в ответ на добавление 10 μM H_2O_2 (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 \pm стандартное отклонение среднего); г – дельта максимального изменения соотношения GFPox/GFPred в ответ на добавление 10 μM H_2O_2 (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm 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 \pm стандартное отклонение среднего)

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 H_2O_2 , сменяемое плавным уменьшением соотношения, которое отражает процесс утилизации H_2O_2 и, соответственно, восстановления МН. Не было обнаружено различий в реакции на перекись водорода между экспериментальными и контрольными нейронами: дельта максимального изменения сигнала (Рисунок 28г) и скорость восстановления достоверно не различались, хотя и можно предполагать наличие тенденции к замедлению восстановления в мутантных моторных нейронах (Рисунок 28д).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка новых подходов для исследования патологии человека – необходима для более детального понимания причин и механизмов развития заболеваний. Модели заболеваний на основе культивируемых клеток перспективны в ряде аспектов: воспроизведение характерных для человека особенностей течения заболевания, возможность масштабирования и исследования на самых ранних этапах, а также, изучения вклада отдельных процессов, которые приводят к развитию патологии. Сочетание различных новых технологий, таких как редактирование генома, репрограммирование к плюрипотентному состоянию и направленная дифференцировка стволовых клеток, культивирование в трехмерных условиях и использование биосенсоров различных процессов позволяет конструировать модели заболеваний в зависимости от нужд исследования и того, на какие вопросы нужно найти ответ.

Нейродегенерация – загадочный патологический процесс, лежащий в основе одноименной группы заболеваний. Боковой амиотрофический склероз, как один из типичных представителей данной группы, отличается широким разнообразием клинических проявлений и этиологии и сложным (и не до конца изученным) патогенезом. При всем этом, нарушения окислительно-восстановительного баланса в моторных нейронах больных, часто указываются в качестве одной из причин гибели клеток (Bosco et al., 2010a; Grosskreutz et al., 2010).

Поэтому в данной работе мы сделали попытку создания такой модели для бокового амиотрофического склероза, которая смогла бы ответить на вопрос: можно ли детектировать влияние мутаций в гене *SOD1*, которые приводят к развитию БАС в клинике, на такую базовую характеристику клеток, как окислительно-восстановительное равновесие?

4.1 Обоснование подходов, использованных для создания модели БАС

В данной работе для получения модели БАС мы использовали не самые стандартные подходы: начиная от создания основы клеточной модели методом внесения однонуклеотидных замен в ген *SOD1* и заканчивая направленной встройкой биосенсоров в геном. Несмотря на дополнительные сложности в ее

получении, перспектива развития этой модели шире, чем при использовании более привычных способов.

4.1.1 Внесение однонуклеотидных замен в ген *SOD1* с помощью CRISPR/Cas9

Индукцированные плюрипотентные клетки, полученные от больных, наиболее надежный источник модели заболевания: ИПСК несут в себе все генетические особенности пациента, в том числе, патологические мутации; наличие клинического эффекта этих мутаций косвенно доказано фактом обращения человека за медицинской помощью.

С одной стороны, использование таких ИПСК, полученных от больных различными генетическими заболеваниями, позволяет исследовать их проявления на уровне клеток *in vitro*. С другой стороны, вместе с болезнетворной мутацией, ИПСК наследуют и другие индивидуальные особенности генотипа пациента, которые могут оказывать модифицирующий эффект на развитие патологии. Этот факт может искажать результаты исследований, полученные на таких моделях и обеспечивать малую сходимость данных между пациентами. Поэтому для повышения значимости необходимо, либо использовать большие выборки, либо устранять влияние генетического фона посредством создания изогенных линий. В большинстве случаев, для создания изогенных линий, исследователи прибегают к исправлению мутации, реже – наоборот, к ее направленному внесению. Результатом, чаще всего, становится пара изогенных «случай-контроль» линий, которые позволяют исследовать эффект конкретной патологической мутации (Ananiev et al., 2011).

В одном лишь гене *SOD1* существует более 180 мутаций, связанных с развитием БАС (<https://alsod.ac.uk/>). При этом, клинические проявления каждой из них имеют свои особенности: средний возраст проявления, скорость прогрессии симптомов и др (Wijesekera, Leigh, 2009). Тем не менее, изогенные клеточные модели, которые позволили бы сравнивать разные мутации в гене *SOD1* друг с другом, отсутствуют. Полученная в ходе данной работы клеточная система позволяет оценить относительное влияние мутаций с.272A>C и с.382G>C на функционирование моторных нейронов в культуре и сравнить их между собой. Обе линии получены на основе одной детально охарактеризованной линии ИПСК K7-4

(Malakhova et al., 2020), которая, в перспективе может быть использована для расширения модели за счет изогенных линий, несущих другие мутации гена *SOD1*, или мутации других генов, ассоциированных с БАС.

Поскольку среди клонов, полученных в результате редактирования, не нашлось гомозиготных вариантов по целевым заменам, мы выбрали те, у которых наравне с целевой заменой в одном аллеле (с.272A>C или с.382G>C), второй аллель был максимально нарушен. Так, делеция *SOD1* линии SOD1-D90A длиной в 105 п.н., затрагивает границу между 3 интроном и 4 экзоном, и, приводит к нарушению сплайсинга мРНК (пропуску 4 экзона) со сдвигом рамки считывания. Образующаяся в результате мРНК, вероятно, либо подвергается нонсенс-опосредованному распаду, либо служит матрицей для образования укороченного измененного белкового продукта (Рисунок 12е). Стоп-кодон в 128 позиции *SOD1* второго аллеля линии SOD1-G127R, вероятно, приводит к образованию усеченного варианта белка *SOD1*, в котором отсутствует необходимый для стабилизации медь-связывающий домен, что, вероятно, также приведет к его быстрой деградации (Рисунок 12е) (Jonsson et al., 2004). Тем не менее, есть основания полагать, что и у полноразмерного варианта *SOD1* с заменой G127R, формирование стабилизирующего домена нарушено схожим образом (Guissart et al., 2020; Pereira et al., 2021). Таким образом, обе мутации, вероятно, оказывают примерно одинаковый эффект на функционирование белка. Этот факт также косвенно подтверждается схожестью отдельных клинических проявлений, описанных для случая замены G127R и для нонсенс-мутаций, приводящих к образованию усеченных форм *SOD1* (Holmøy et al., 2010; Park et al., 2019). Однако, вопрос конкретных белковых нарушений, к которым они приводят, в данной работе не рассматривался и вполне может стать основой для отдельного самостоятельного исследования.

4.1.2 Встройка генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-индуцируемой экспрессии биосенсоров, в локус *AAVS1*

Использование генетически-кодируемых биосенсоров для изучения клеточных процессов является одним из перспективных подходов в биомедицине, ввиду простоты конструирования, доставки, низкой степени влияния на

функционирование клетки и возможности проведения прижизненных динамических измерений (Miyawaki et al., 1997).

Традиционно для исследований клеток при помощи генетически-кодируемых биосенсоров либо применяют плазмиды, обеспечивающие временную экспрессию биосенсора, либо интегрируют в геном последовательности биосенсоров при помощи вирусов. Эти методы относительно просты, но имеют ряд недостатков. При использовании биосенсоров с временной экспрессией невозможно исследовать клеточные процессы в течение длительного времени, поскольку с каждым клеточным циклом будет происходить его элиминация. Вирусно-опосредованнаястройка же, напротив, обеспечивает стабильный уровень экспрессии биосенсоров. Однако так как процесс интеграции неуправляем, неизвестно, каким образом случайно встроившиеся копии биосенсоров повлияют на функционирование клетки, и может ли это привести к искажению итогового результата исследования.

Направленнаястройка трансгенов в специфические «safe harbor» локусы генома, такие как сайт аденоассоциированного вируса (*AAVSI*), расположенный на 19 хромосоме человека, обеспечивает стабильную экспрессию трансгенов и позволяет избежать влияния самого факта встройки на функционирование клетки (Kotin et al., 1992). Кроме того, использование направленной встройки биосенсора позволяет контролировать количество его копий в геноме, что в теории должно исключить значительные различия в силе сигнала биосенсора и его чувствительности.

Постоянное присутствие последовательности биосенсора в сочетании с возможностью управления его экспрессией путем добавления доксициклина в культуральную среду должно было обеспечить условия для длительных наблюдений за состоянием клеток при такой необходимости и, при этом, возможность отменять экспрессию сенсора, если исследование не проводится. Однако, обнаруженное снижение интенсивности сигнала биосенсора в моторных нейронах при индукции на финальных стадиях дифференцировки (Рисунок 19а), заставило пересмотреть стратегию исследования и индуцировать экспрессию биосенсоров в течение всего периода дифференцировки (Рисунок 6, 16).

Анализ мРНК показал, что при сохранной экспрессии трансаактиватора вне зависимости от присутствия, или отсутствия доксициклина, экспрессия биосенсора

индуцировалась значительно слабее, если доксициклин добавлялся в финале протокола дифференцировки. Причем, экспрессия биосенсора в нейронах, которым регулярно добавляли доксициклин, не отличалась от экспрессии биосенсора в ИПСК, из которых они были получены (Рисунок 19б). Таким образом, мы обнаружили, что для клеток, дифференцированных из ИПСК, сайт *AAVSI* не совсем «safe-harbor» локус, поскольку промотеры 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).

Обнаруженный факт ставит под сомнение возможность использования сайта *AAVSI* для встройки трансгенов, чья экспрессия не может находиться в постоянно активированном состоянии, например, репортерные конструкции, управляемые тканеспецифичными промоторами. Для экспрессии биосенсоров данное обстоятельство лишь накладывает дополнительные условия и не препятствует исследованию клеточных линий с их помощью. Тем не менее, необходимость поиска новых «safe-harbor» локусов в геноме человека является особенно актуальной задачей ввиду все более интенсивного использования методик направленных встроек трансгенов в геном.

4.2 Особенности реакции биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1

Биосенсоры Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 могут использоваться как для мониторинга стационарного уровня перекиси водорода в соответствующих компартментах, так и для исследования ее колебаний в динамических тестах. В ходе работы было обнаружено, что показания обоих сенсоров обладают крайне высокой степенью зависимости от условий содержания нейронов, состава среды для съемки, интенсивности сигнала и подбора настроек для микроскопии. Так, при съемке на 29 день дифференцировки мы обнаружили, что у нейронов, предварительно повергшихся голоданию, стационарная степень окисления биосенсора Mito-roGFP2-Orp1, была в 4 раза выше относительно значения Cyto-roGFP2-Orp1 в контрольных МН, и МН с мутацией D90A (Рисунок 23а). Чего,

однако, не наблюдалось в клетках, культивируемых в полноценной среде, ни на тот же 29 день дифференцировки, ни на 32 день дифференцировки (Рисунок 23 б, г). Такие различия можно объяснить тем, что депривация питательных веществ, сама по себе, провоцирует стресс, который выражается в нарушении баланса между продукцией и утилизацией активных форм кислорода в митохондриях нейронов. Примечательно, что такой же разницы в сенсоре Cyto-roGFP2-Orp1 обнаружено не было, что говорит о большей стабильности уровня H_2O_2 в цитоплазме, а также о том, что даже тот подъем уровня H_2O_2 , который наблюдается в митохондриях, не является критичным в данных условиях и его эффект не распространяется за пределы митохондрий.

И, хотя значение степени окисления сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 не зависело от того, подвергались ли нейроны голоданию, график реакции таких клеток на добавление перекиси водорода отличался гораздо менее выраженной дельтой максимального окисления, а также более низкой скоростью восстановления клеток (Рисунок 24). С одной стороны, это говорит о том, что в условиях полноценной питательной среды, МН меньше подвержены воздействию перекиси водорода (небольшая дельта реакции), что, вероятно, обусловлено защитными свойствами среды, в которой они пребывали до исследования. С другой, скорость восстановления нейронов в таких условиях тоже была ниже. Этот эффект можно объяснить тем, что нейроны, находящиеся в условиях кратковременной депривации питательных веществ, способны к адаптации в новых условиях, и более активно реагируют на негативные факторы внешней среды (согласно теории стресса) (Taylor, Crack, 2004). Остается открытым вопрос, как долго моторные нейроны смогут пребывать в условиях недостатка питательных веществ, и возникнут ли отличия между нормальными и мутантными по *SOD1* МН при пролонгировании эксперимента. Некоторые авторы успешно используют дефицитные по питательным веществам среды для индукции патологического фенотипа на совместных культурах МН и астроцитов (Du et al., 2015). И, вероятно, в случае созданной модели, такой подход также сможет оправдать себя.

Различия в реакции сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 на депривацию питательных веществ отражают определенную степень независимости в работе антиокислительных систем данных компартментов клетки.

Дополнительно, этот факт подтверждается реакцией сенсоров в ответ на добавление перекиси водорода в среду (Рисунок 25, 26). Отсутствие значительных изменений в ответ на 10 мкМ H_2O_2 в сенсоре Mito-roGFP2-Orp1 при наличии полноценной реакции сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 говорит о том, что подавляющее большинство молекул H_2O_2 при ее добавлении извне перерабатывается именно антиокислительной системой цитоплазмы и не попадает в митохондрии. Наличие же реакции только в ответ на те концентрации перекиси водорода, которые оказываются летальными для МН, свидетельствует о том, что превышение уровня перекиси водорода в цитоплазме выше значений, которые она способна обезвредить, приводит к перемещению молекул H_2O_2 внутрь митохондрий и запуску механизма клеточной гибели. В предыдущих работах, использовавших подобные сенсоры, такого эффекта замечено не было, вероятно, ввиду использования других модельных систем, таких как линии НЕК293, дрожжи, эмбрионы полосатого данио и другие (Gutscher et al., 2008; Panieri et al., 2017). Эти модельные системы отличаются большей толерантностью к действию перекиси водорода, чем культивируемые МН, и, соответственно, большими техническими возможностями в использовании митохондриальных сенсоров.

Другой неожиданной стороной работы сенсора Mito-roGFP2-Orp1 стало отсутствие какой-либо реакции клеток в эксперименте с индукцией глутаматного стресса (Рисунок 27б). Несмотря на то, что митохондриальная дисфункция – один из компонентов эксайтотоксичности – каких-либо изменений в сигнале Mito-roGFP2-Orp1 в экспериментальном образце по сравнению с контролем не отмечалось. Степень окисления сенсора к 5 суткам наблюдений действительно повышалась в отдельных образцах МН, однако, никакой закономерности обнаружено не было. Причина может быть как в недостаточной индукции эксайтотоксичности, так и в технических особенностях визуализации сенсора Mito-roGFP2-Orp1. В первом случае, выбранная концентрация глутамата может недостаточно активно провоцировать стресс, вследствие чего, существующая биологическая вариабельность между образцами скрывает разницу в эксперименте. Во втором случае, проблема кроется в сложности получения сигнала от Mito-roGFP2-Orp1. Поскольку roGFP2 в сенсоре физически связан с митохондриями, интенсивность сигнала может варьировать в зависимости от их количества и

распределения в цитоплазме (Рисунок 29). Для МН характерно аккумуляирование большого количества митохондрий внутри относительно небольшого тела, что создает трудности в подборе условий для микроскопии, при которых разные участки исследуемого образца будут иметь удовлетворительные параметры изображения: достаточная интенсивность при отсутствии участков сатурации. К сожалению, не всегда это было достижимо вследствие особенностей роста нейронов и изменения параметров сигнала в течение эксперимента.

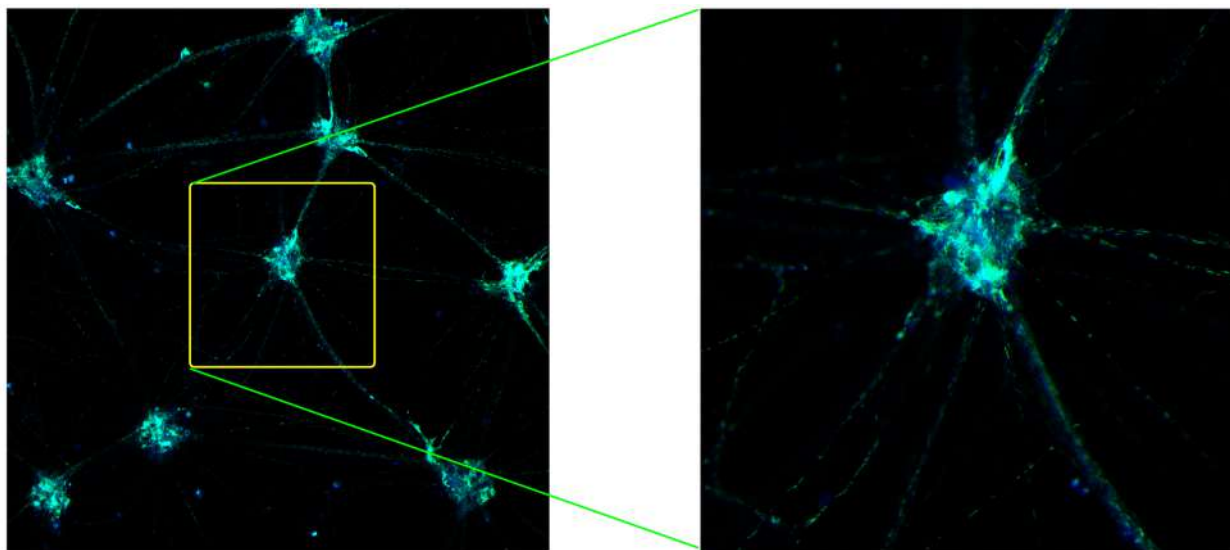


Рисунок 29. Визуализация сенсора Mito-roGFP2-Orp1 в моторных нейронах. Сигнал зеленого цвета – восстановленная форма roGFP2, сигнал синего цвета – окисленная форма roGFP2. В рамку выделена и увеличена часть изображения, демонстрирующая один из участков скопления тел нейронов, отличающихся перенасыщением изображения.

4.3 Влияние мутаций в гене *SOD1* на функционирование моторных нейронов, полученных из ИПСК

Окислительный стресс – один из основных патофизиологических процессов, приводящих к гибели нейронов при БАС. Нарушение баланса между образованием активных форм кислорода и их утилизацией косвенно выражается в увеличении концентрации промежуточных продуктов, таких как H_2O_2 . Несмотря на то, что именно *SOD1* катализирует образование перекиси из супероксид-радикалов, современные представления касательно патологии БАС не рассматривают потерю функции, как основную причину развития патологии. Скорее, наоборот, мутации в *SOD1* связывают с повышением концентрации H_2O_2 , а также с увеличением

образования не менее вредоносных для клетки гидроксил-радикалов (Liu et al., 1999; Moon Bin Yim et al., 1996).

В подавляющем большинстве случаев, БАС проявляется в зрелом возрасте, из-за чего, его моделирование на клеточных линиях затруднено, поскольку требуется время для развития заметных патологических изменений. Мутации, которые были внесены в ИПСК для создания модели в данной работе отличаются друг от друга. 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 (Vali et al., 2017). Кроме того, известно, что среди пациентов с БАС, мутация с.272A>C может иметь как рецессивный, так и доминантный тип наследования, что позволяет предполагать наличие пока неизвестного фактора-модификатора заболевания у таких людей (Andersen et al., 1997). 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 моторных нейронов и выраженным болевым синдромом, резистентным к лечению опиоидами (Holmøy et al., 2010).

Негативный эффект мутации с.382G>C проявил себя более высоким базовым уровнем перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях по сравнению с контрольными нейронами K7-4 и нейронами SOD1-D90A уже по окончании дифференцировки (Рисунок 23б). Кроме того, депривация питательных веществ повышала степень окисления не только биосенсора Mito-roGFP2-Orp1, но и Cyto-roGFP2-Orp1, чего не наблюдалось для других линий (Рисунок 23а), что говорит о существовании дополнительных стрессовых факторов для этих нейронов, которые голодание только усиливает.

Примечательно, что положительное влияние нейротрофических факторов ограничивалось снижением уровня H_2O_2 в только цитоплазме и только на 29 день дифференцировки (Рисунок 23в, 23д). Невозможность коррекции высокого уровня

митохондриальной H_2O_2 объясняется наличием неразрешимых нарушений в функционировании органоида, которые приводят к гибели клетки. Как и в случае с динамическими экспериментами по утилизации перекиси водорода: повышение уровня H_2O_2 в митохондриях сложнее спровоцировать ввиду активной работы системы по ее обезвреживанию, но, если это происходит, то следующий за ним процесс гибели клетки остановить уже нельзя. Об этом косвенно говорит снижение положительного эффекта трофических факторов в течение последующих трех дней культивирования. Снижение скорости роста аксонов, которое мы наблюдали для моторных нейронов с данной мутацией (Рисунок 20), также является признаком нарушения функции митохондрий: энергетический дефицит, как следствие дисфункции вынуждает клетку «экономить» на нежизненно важных процессах, таких как перестройка цитоскелета (Shi et al., 2010).

Таким образом, можно говорить, что для гибели моторных нейронов линии SOD1-G127R нарушение баланса окислительно-восстановительных реакций в митохондриях является первичным и именно митохондриальная дисфункция лежит в основе наблюдаемых явлений (Allen et al., 2014).

Несмотря на значимое, пусть и не такое выраженное, снижение скорости роста аксонов (Рисунок 20), для моторных нейронов с мутацией с.272A>C не было обнаружено отличий от контроля в уровне перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях, что было ожидаемо, так как данная мутация отличается крайне благоприятным течением (Al-Chalabi et al., 2013). Наблюдаемое снижение степени окисления сенсоров в моторных нейронах iALS, вероятно, связано с особенностями линии ИПСК, из которой клоны были получены, а не с самой мутацией, поскольку нейроны SOD1-D90A, изогенные контролю K7-4 демонстрировали аналогичные показатели (Рисунок 23а, 23г). Это лишний раз доказывает необходимость использования изогенных клеточных линий в экспериментах, поскольку подобные отличия могут возникать повсеместно и провоцировать на неправильные выводы.

В ходе эксперимента по индукции эксайтотоксичности нам не удалось получить внятных данных относительно влияния глутамата натрия на мутантные моторные нейроны (Рисунок 27в, 27г). Несмотря на то, что уровень H_2O_2 в цитоплазме по окончании эксперимента был достоверно выше для каждого

отдельно взятого клона (Рисунок 27а), их объединение в одну выборку нивелировало все различия ввиду большого разброса значений между повторностями. Таким образом, влияние глутамата на уровень перекиси водорода в цитоплазме оказалось достоверным только в случае линии SOD1-D90A (Рисунок 27в). Значимой разницы в реакции на глутамат между контрольными МН и МН линий iALS и SOD1-D90A также отмечено не было, хотя и есть основания предполагать наличие тенденции к большему окислению цитоплазмы мутантных МН (Рисунок 27г). То же самое касалось и динамических тестов по утилизации перекиси водорода: для каждой отдельно взятой линии скорость восстановления клеток была снижена после глутаматного теста, однако, в целом, различия оказались незначимы (Рисунок 28).

Вероятно, параметры глутаматного теста оказались неоптимальными: использованной концентрации глутамата натрия оказалось недостаточно для индукции изменений, более выраженных, чем вариативность между клонами. В пользу этой гипотезы выступает тот факт, что по окончании теста, клетки не теряли своей способности к восстановлению после добавления H_2O_2 , а, значит, существует возможность для ужесточения условий эксперимента. Или же, эффект мутации *s.272A>C* все же слабо проявляется в полученной клеточной модели ввиду недостаточного уровня созревания моторных нейронов и общего относительно благоприятного характера мутации. Подтвердить или опровергнуть наличие значимой разницы для такого слабого эффекта смогут только дополнительные исследования с другими параметрами и с включением в выборку большего количества повторов.

4.4 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- Билан Д.С., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Генетически Кодированные Флуоресцентные Сенсоры Окислительно-Восстановительных Процессов (Обзорная Статья) // Биоорганическая Химия. 2015. Т. 41. № 3. С. 259–274.
- Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2014. 2-е издание. 376 с.
- Aasen T. et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26. № 11. P. 1276–1284.
- Abdelfattah A.S. et al. Ratiometric and photoconvertible fluorescent protein-based voltage indicator prototypes // *Chem. Commun.* 2016. Vol. 52. № 98. P. 14153–14156.
- Abe K. et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet Neurol.* 2017. Vol. 16. № 7. P. 505–512.
- Al-Chalabi A. et al. Genetic and epigenetic studies of amyotrophic lateral sclerosis. // *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2013. Vol. 14 Suppl 1. P. 44–52.
- Al-Chalabi A., Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. Vol. 9. № 11. P. 617–628.
- Alami N.H. et al. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations // *Neuron.* 2014. Vol. 81. № 3. P. 536–543.
- Alemasov N.A. et al. Dynamic properties of SOD1 mutants can predict survival time of patients carrying familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017. Vol. 35. № 3. P. 645–656.
- Allen S.P. et al. Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis // *Neurobiol. Aging.* 2014. Vol. 35. № 6. P. 1499–1509.
- Alves C.J. et al. Gene expression profiling for human iPS-derived motor neurons from sporadic ALS patients reveals a strong association between mitochondrial functions and neurodegeneration // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. Vol. 9. P. 289.

- Anand P. et al. Application of a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensor for detection of drug-induced apoptosis in a 3D breast tumor model // *Biotechnol. Bioeng.* 2015. Vol. 112. № 8. P. 1673–1682.
- Ananiev G. et al. Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. № 9. P. e25255.
- Andersen P.M. et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with Cu Zn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia // *Brain.* 1997. Vol. 120. № 10. P. 1723–1737.
- Alzheimer's Association report. Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's & Dementia.* 2017. Vol. 13. № 4. P. 1–85.
- Aulas A., Velde C. Vande. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. Vol. 9. P. 423.
- Avior Y., Sagi I., Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. Vol. 17. № 3. P. 170–182.
- Ayala Y.M. et al. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43 // *J. Cell Sci.* 2008. Vol. 121. № 22. P. 3778–3785.
- Ayers J.I. et al. Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease // *Acta Neuropathol.* 2014. Vol. 128. № 6. P. 791–803.
- Bagchi M. et al. Oxidative stress and neurodegeneration // *Vet. Toxicol.* 2007. Vol. 4911. P. 313–334.
- Bali T. et al. Defining SOD1 ALS natural history to guide therapeutic clinical trial design // *Physiol. Behav.* 2017. Vol. 88. № 2. P. 99–105.
- Barber S.C., Shaw P.J. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 48. № 5. P. 629–641.
- Barmada S.J. et al. Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models // *Nat. Chem. Biol.* 2014. Vol. 10. № 8. P. 677–685.
- Basso M. et al. Mutant Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Induces Protein

Secretion Pathway Alterations and Exosome Release in Astrocytes // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. № 22. P. 15699–15711.

Bellingham M.C. A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? // *CNS Neurosci. Ther.* 2011. Vol. 17. № 1. P. 4–31.

Bensimon G., Lacomblez L., Meininger V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis // *N. Engl. J. Med.* 1994. Vol. 330. № 9. P. 585–591.

Bento-Abreu A. et al. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis // *Eur. J. Neurosci.* 2010. Vol. 31. № 12. P. 2247–2265.

Berg J., Hung Y.P., Yellen G. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio // *Nat. Methods.* 2009. Vol. 6. № 2. P. 161–166.

Bilican B. et al. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109. № 15. P. 5803–5808.

Boillee S. et al. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia // *Science.* 2006. Vol. 312. № 5778. P. 1389–1392.

Boillée S., Velde C. Vande, Cleveland D.W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors // *Neuron.* 2006. Vol. 52. № 1. P. 39–59.

Bosco D.A. et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS // *Nat. Neurosci.* 2010a. Vol. 13. № 11. P. 1396–1403.

Bosco D.A. et al. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules // *Hum. Mol. Genet.* 2010b. Vol. 19. № 21. P. 4160–4175.

Breus O., Dickmeis T. Genetically encoded thiol redox-sensors in the zebrafish model: lessons for embryonic development and regeneration // *Biol. Chem.* 2020. Vol. 402. № 3. P. 363–378.

Brusa R. et al. Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. // *Science.* 1995. Vol. 270. № 5242. P. 1677–1680.

- Bursch F. et al. Altered calcium dynamics and glutamate receptor properties in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with C9orf72, FUS, SOD1 or TDP43 mutations // *Hum. Mol. Genet.* 2019. Vol. 28. № 17. P. 2835–2850.
- Casci I., Pandey U.B. A fruitful endeavor: Modeling ALS in the fruit fly // *Brain Res.* 2015. Vol. 1607. P. 47–74.
- Cassina P. et al. Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. № 16. P. 4115–4122.
- Castillo K. et al. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons // *Autophagy.* 2013. Vol. 9. № 9. P. 1308–1320.
- Chang C.-W. et al. Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting // *Cell Rep.* 2015. Vol. 12. № 10. P. 1668–1677.
- Chen H. et al. Modeling ALS with iPSCs Reveals that Mutant SOD1 Misregulates Neurofilament Balance in Motor Neurons // *Cell Stem Cell.* 2014. Vol. 14. № 6. P. 796–809.
- Chen S. et al. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update // *Mol. Neurodegener.* 2013. Vol. 8. P. 28.
- Chen Y. et al. Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration // *Protein Cell.* 2011. Vol. 2. № 6. P. 477–486.
- Chia R. et al. Superoxide Dismutase 1 and tgSOD1G93A Mouse Spinal Cord Seed Fibrils, Suggesting a Propagative Cell Death Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. № 5. P. e10627.
- Chinta S.J., Andersen J.K. Redox imbalance in Parkinson's disease // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2008. Vol. 1780. № 11. P. 1362–1367.
- Chiriboga C.A. et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN_{Rx}) in children with spinal muscular atrophy // *Neurology.* 2016. Vol. 86. № 10. P. 890–897.
- Ciechanover A., Kwon Y.T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies // *Exp. Mol. Med.* 2015. Vol. 47. № 3. P.

e147.

Corona J.C., Tapia R. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo // *J. Neurochem.* 2004. Vol. 89. № 4. P. 988–997.

Dafinca R. et al. C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia // *Stem Cells.* 2016. Vol. 34. № 8. P. 2063–2078.

Damme P. Van et al. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104. № 37. P. 14825–14830.

Das A.T., Tenenbaum L., Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression // *Curr. Gene Ther.* 2016. Vol. 16. № 3. P. 156–67.

Deng J. et al. FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage // *PLoS Genet.* 2015. Vol. 11. № 9. P. 1–30.

Dimos J.T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons // *Science.* 2008. Vol. 321. № 5893. P. 1218–1221.

Dittmer P.J. et al. Genetically Encoded Sensors to Elucidate Spatial Distribution of Cellular Zinc // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. № 24. P. 16289–16297.

Donnelly C.J. et al. Axonally synthesized β -actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth. // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33. № 8. P. 3311–3322.

Dorst J., Ludolph A.C., Huebers A. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis // *Ther. Adv. Neurol. Disord. Rev.* 2017. Vol. 11. P. 1–16.

Du Z.-W. et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 6626.

Enns G.M., Cowan T.M. Glutathione as a Redox Biomarker in Mitochondrial Disease—Implications for Therapy // *J. Clin. Med.* 2017. Vol. 6. P. 50.

Esposito S. et al. Redox-sensitive GFP to monitor oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Rev. Neurosci.* 2017. Vol. 28. № 2. P. 133–144.

- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. Vol. 292. P. 154-156.
- Ezzi S.A., Urushitani M., Julien J.-P. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 102. № 1. P. 170–178.
- Fallini C., Bassell G.J., Rossoll W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth // *Hum. Mol. Genet.* 2012. Vol. 21. № 16. P. 3703–3718.
- Ferraiuolo L. et al. Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis // *Brain*. 2011. Vol. 134. № 9. P. 2627–2641.
- Ferraiuolo L. et al. Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113. № 42. P. e6496–6505.
- Firth A.L. et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs // *Cell Rep.* 2015. Vol. 12. № 9. P. 1385–1390.
- Foust K.D. et al. Therapeutic AAV9-mediated Suppression of Mutant SOD1 Slows Disease Progression and Extends Survival in Models of Inherited ALS // *Mol. Ther.* 2013. Vol. 21. № 12. P. 2148–2159.
- Frakes A.E. et al. Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF- κ B Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis // *Neuron*. 2014. Vol. 81. № 5. P. 1009–1023.
- Freedman B.S. et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. № 1. P. 8715.
- Fritz E. et al. Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability // *J. Neurophysiol.* 2013. Vol. 109. № 11. P. 2803–2814.
- Gal J. et al. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 111. № 4. P. 1062–1073.

- Gerber Y.N. et al. Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // PLoS One. 2012. Vol. 7. № 4. P. e36000.
- Ghaffari L.T. et al. Representing diversity in the dish: Using patient-derived in vitro models to recreate the heterogeneity of neurological disease // Front. Neurosci. 2018. Vol. 12. P. 56.
- Giannini F. et al. D90A-SOD1 mutation in ALS: The first report of heterozygous Italian patients and unusual findings // Amyotroph. Lateral Scler. 2010. Vol. 11. № 1–2. P. 216–219.
- Giorgio F.P. Di et al. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model // Nat. Neurosci. 2007. Vol. 10. № 5. P. 608–614.
- Grad L.I. et al. Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. Vol. 108. № 39. P. 16398–16403.
- Grosskreutz J., Bosch L. Van Den, Keller B.U. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis // Cell Calcium. 2010. Vol. 47. № 2. P. 165–174.
- Grune T. et al. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 305. № 3. P. 709–718.
- Guissart C. et al. Premature termination codons in SOD1 causing Amyotrophic Lateral Sclerosis are predicted to escape the nonsense-mediated mRNA decay // Sci. Rep. 2020. Vol. 20. P. 20738.
- Gurney M.E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation // Science. 1994. Vol. 264. № 5166. P. 1772–1775.
- Gurney M.E. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies // J. Neurol. Sci. 1997. Vol. 152 Suppl 1. P. S67-73.
- Gutscher M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential // Nat. Methods. 2008. Vol. 5. № 6. P. 553–559.
- Gutscher M. et al. Proximity-based Protein Thiol Oxidation by H₂O₂-scavenging Peroxidases // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. № 46. P. 31532–31540.
- Ha J.S. et al. Design and application of highly responsive fluorescence resonance energy transfer biosensors for detection of sugar in living *Saccharomyces cerevisiae* cells //

- Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. № 22. P. 7408–7414.
- Haidet-Phillips A.M. et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons // Nat. Biotechnol. 2011. Vol. 29. № 9. P. 824–828.
- Hartley B.J., Brennand K.J. Neural organoids for disease phenotyping, drug screening and developmental biology studies // Neurochem. Int. 2017. Vol. 106. P. 85–93.
- Harvey C.D. et al. A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. № 49. P. 19264–19269.
- Haynes C.M., Titus E.A., Cooper A.A. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death // Mol. Cell. 2004. Vol. 15. № 5. P. 767–776.
- Hedlund E. et al. Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection // Brain. 2010. Vol. 133. № 8. P. 2313–2330.
- Heim N., Griesbeck O. Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. № 14. P. 14280–14286.
- Hemerka J.N. et al. Detection and Characterization of Influenza A Virus PA-PB2 Interaction through a Bimolecular Fluorescence Complementation Assay // J. Virol. 2009. Vol. 83. № 8. P. 3944–3955.
- Henkel J.S. et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue // Ann. Neurol. 2004. Vol. 55. № 2. P. 221–235.
- Hideyama T. et al. Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons // Neurobiol. Dis. 2012. Vol. 45. № 3. P. 1121–1128.
- Hires S.A., Zhu Y., Tsien R.Y. Optical measurement of synaptic glutamate spillover and reuptake by linker optimized glutamate-sensitive fluorescent reporters // Proc Natl Acad Sci USA. 2008. Vol. 105. № 11. P. 4411–4416.
- Hollenbeck P.J. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport // J. Cell Biol. 1993. Vol. 121. № 2. P. 305–315.
- Holmøy T. et al. G127R: A novel SOD1 mutation associated with rapidly evolving ALS

- and severe pain syndrome // *Amyotroph. Lateral Scler.* 2010. Vol. 11. № 5. P. 478–480.
- Horii T. et al. Generation of an ICF Syndrome Model by Efficient Genome Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using the CRISPR System // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. № 10. P. 19774–19781.
- Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea // *Science.* 2010. Vol. 327. № 5962. P. 167–170.
- Huangfu D. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26. № 11. P. 1269–1275.
- Hwang W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31. № 3. P. 227–229.
- Hwang Y.-M. et al. Nonamyloid Aggregates Arising from Mature Copper/Zinc Superoxide Dismutases Resemble Those Observed in Amyotrophic Lateral Sclerosis // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. № 53. P. 41701–41711.
- Israel M.A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells // *Nature.* 2012. Vol. 482. № 7384. P. 216–220.
- Jiang L.I. et al. Use of a cAMP BRET Sensor to Characterize a Novel Regulation of cAMP by the Sphingosine 1-Phosphate/G13 Pathway // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282. № 14. P. 10576–10584.
- Jinek M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity // *Science.* 2012. Vol. 337. № 6096. P. 816–821.
- Johnson D.E. et al. Red fluorescent protein pH biosensor to detect concentrative nucleoside transport // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. № 31. P. 20499–20511.
- Johnson M.A. et al. Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27. № 12. P. 3069–3077.
- Jones E. V., Cook D., Murai K.K. A Neuron-Astrocyte Co-Culture System to Investigate Astrocyte-Secreted Factors in Mouse Neuronal Development // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).*, 2012. P. 341–352.
- Jonsson P.A. et al. Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause

amyotrophic lateral sclerosis // *Brain*. 2004. Vol. 127. № 1. P. 73–88.

Kausar S., Wang F., Cui H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases // *Cells*. 2018. Vol. 7. № 12. P. 274.

Kawahara Y. et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons // *Nature*. 2004. Vol. 427. № 6977. P. 801–801.

Kim N.H. et al. Oxidative modification of neurofilament-L by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system // *Biochimie*. 2004. Vol. 86. № 8. P. 553–559.

Kishino Y. et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral T Cells Using Sendai Virus in Feeder-free Conditions // *J. Vis. Exp.* 2015. № 105. P. 53225.

Kiskinis E. et al. Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1 // *Cell Stem Cell*. 2014. Vol. 14. № 6. P. 781–795.

Klatt D. et al. Differential Transgene Silencing of Myeloid-Specific Promoters in the AAVS1 Safe Harbor Locus of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Myeloid Cells // *Hum. Gene Ther.* 2020. Vol. 31. № 3–4. P. 199–210.

Knight E., Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro // *J. Anat.* 2015. Vol. 227. № 6. P. 746–756.

Kotin R.M., Linden R.M., Berns K.I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination // *EMBO J.* 1992. Vol. 11. № 13. P. 5071.

Kumimoto E.L., Fore T.R., Zhang B. Transcriptome Profiling Following Neuronal and Glial Expression of ALS-Linked SOD1 in *Drosophila* // *G3; Genes|Genomes|Genetics*. 2013. Vol. 3. № 4. P. 695–708.

Lagier-Tourenne C. et al. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs // *Nat. Neurosci.* 2012. Vol. 15. № 11. P. 1488–1497.

Laird F.M. et al. Motor Neuron Disease Occurring in a Mutant Dynactin Mouse Model Is Characterized by Defects in Vesicular Trafficking // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28. № 9. P.

1997–2005.

Langenhove T. Van, Zee J. van der, Broeckhoven C. Van. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum // *Ann. Med.* 2012. Vol. 44. № 8. P. 817–828.

Leigh P.N. et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity // *Brain*. 1991. Vol. 114 (Pt 2). P. 775–788.

Lemmens R. et al. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish // *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. № 19. P. 2359–2365.

Li J., Sung M., Rutkove S.B. Electrophysiologic Biomarkers for Assessing Disease Progression and the Effect of Riluzole in SOD1 G93A ALS Mice // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. № 6. P. e65976.

Li K. et al. Manipulation of prostate cancer metastasis by locus-specific modification of the CRMP4 promoter region using chimeric TALE DNA methyltransferase and demethylase // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. № 12. P. 10030–10044.

Ligon L.A. et al. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons // *Neuroreport*. 2005. Vol. 16. № 6. P. 533–536.

Lindenburg L.H. et al. MagFRET: The First Genetically Encoded Fluorescent Mg²⁺ Sensor // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. № 12. P. e82009.

Ling S.-C. et al. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. № 30. P. 13318–13323.

Ling S.-C., Polymenidou M., Cleveland D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis // *Neuron*. 2013. Vol. 79. № 3. P. 416–438.

Liu-Yesucevitz L. et al. Local RNA translation at the synapse and in disease. // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. № 45. P. 16086–16093.

Liu D. et al. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. № 15. P. 2318–2328.

- Liu Y. et al. Expression of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked SOD1 Mutant Increases the Neurotoxic Potential of Microglia via TLR2 // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. № 6. P. 3691–3699.
- Logroscino G. et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2010. Vol. 81. № 4. P. 385–390.
- Lukyanov K.A., Belousov V. V. Genetically encoded fluorescent redox sensors // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2014. Vol. 1840. № 2. P. 745–756.
- Ma J. et al. Prion-like mechanisms in Parkinson's disease // *Front. Neurosci.* 2019. Vol. 13. P. 552.
- Mack A.A. et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from CD34 + Cells across Blood Drawn from Multiple Donors with Non-Integrating Episomal Vectors // 2011. Vol. 6. № 11. P. e27956.
- Madill M. et al. Amyotrophic lateral sclerosis patient iPSC-derived astrocytes impair autophagy via non-cell autonomous mechanisms // *Mol. Brain.* 2017. Vol. 10. № 1. P. 22.
- Malakhova A.A. et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from peripheral blood mononuclear cells of a patient with Wilson's disease // *Stem Cell Res.* 2020. Vol. 47. № June. P. 101922.
- Mali P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // *Science.* 2013. Vol. 339. № 6121. P. 823–826.
- Marcaggi P. et al. Optical measurement of mGluR1 conformational changes reveals fast activation, slow deactivation, and sensitization // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106. № 27. P. 11388–11393.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981. Vol. 78. № 12. P. 7634–7638.
- Matus S., Medinas D.B., Hetz C. Common Ground: Stem Cell Approaches Find Shared Pathways Underlying ALS // *Cell Stem Cell.* 2014. Vol. 14. № 6. P. 697–699.
- Maurel C. et al. Causative Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Protein Degradation Pathways: a Link to Neurodegeneration // *Mol. Neurobiol.* 2018. P. 1–20.

- McGoldrick P. et al. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2013. Vol. 1832. № 9. P. 1421–1436.
- Meyer K. et al. Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111. № 2. P. 829–832.
- Miesenböck G., Angelis D.A. & De, Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins // *Nature.* 1998. Vol. 394. № July. P. 192–195.
- Millecamps S., Julien J.P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14. № 3. P. 161–176.
- Miller K.E. et al. BiFC analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies // *J. Mol. Biol.* 2016. Vol. 427. № 11. P. 2039–2055.
- Miller R.G. et al. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). // *Cochrane database Syst. Rev.* 2012. Issue 3. Art. No.: CD001447.
- Miller T.M. et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study // *Lancet Neurol.* 2013. Vol. 12. № 5. P. 435–442.
- Minina J.M. et al. Standard DAPI karyotype of the common shrew *Sorex araneus* L. (Soricidae, Eulipotyphla) // *Russ. J Teriology.* 2007. Vol. 6. № 1. P. 3–6.
- Mitne-Neto M. et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. № 18. P. 3642–3652.
- Miyawaki A. et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin // *Nature.* 1997. Vol. 388. № 6645. P. 882–887.
- Mizuno T. et al. Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia // *Neuropharmacology.* 2004. Vol. 46. № 3. P. 404–411.
- Mizuno T. et al. Metal-ion-dependent GFP emission in vivo by combining a circularly permuted green fluorescent protein with an engineered metal-ion-binding coiled-coil //

J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. № 37. P. 11378–11383.

Moeyaert B., Dedecker P. Genetically encoded biosensors based on innovative scaffolds // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2020. Vol. 125. P. 105761.

Moon Bin Yim et al. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in $K(m)$ for hydrogen peroxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93. № 12. P. 5709–5714.

Morgan B., Sobotta M.C., Dick T.P. Measuring EGSHand H₂O₂ with roGFP2-based redox probes // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51. № 11. P. 1943–1951.

Münch C. et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. // *Neurology.* 2004. Vol. 63. № 4. P. 724–726.

Münch C. et al. Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD // *Ann. Neurol.* 2005. Vol. 58. № 5. P. 777–780.

Münch C., O'Brien J., Bertolotti A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108. № 9. P. 3548–3553.

Nagai M. et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons // *Nat. Neurosci.* 2007. Vol. 10. № 5. P. 615–622.

Nausch L.W.M. et al. Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. № 1. P. 365–370.

Noto Y. et al. Novel therapies in development that inhibit motor neuron hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis // *Expert Rev. Neurother.* 2016. Vol. 16. № 10. P. 1147–1154.

Oeda T. et al. Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans* // *Hum. Mol. Genet.* 2001. Vol. 10. № 19. P. 2013–2023.

Okita K. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells.* 2013.

Vol. 31. № 3. P. 458–466.

Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2007. Vol. 448. № 7151. P. 313–317.

Okumoto S., Jones A., Frommer W.B. Quantitative Imaging with Fluorescent Biosensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. Vol. 63. № 1. P. 663–706.

Ordovás L. et al. Efficient recombinase-mediated cassette exchange in hPSCs to study the hepatocyte lineage reveals AAVS1 locus-mediated transgene inhibition // *Stem Cell Reports*. 2015. Vol. 5. № 5. P. 918–931.

Osborn M.J. et al. Fanconi Anemia Gene Editing by the CRISPR/Cas9 System // *Hum. Gene Ther.* 2015. Vol. 26. № 2. P. 114–126.

Ousterout D.G. et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 6244.

Pain B. et al. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities // *Development*. 1996. Vol. 122. № 8. P. 2339–2348.

Panieri E., Millia C., Santoro M.M. Real-time quantification of subcellular H₂O₂ and glutathione redox potential in living cardiovascular tissues // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 109. P. 189–200.

Papadeas S.T. et al. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108. № 43. P. 17803–17808.

Parakh S., Atkin J.D. Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis // *Brain Res.* 2016. Vol. 1648. P. 633–649.

Park C.-Y. et al. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111. № 25. P. 9253–9258.

Park J.H. et al. SOD1 deficiency : a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis // 2019. P. 2230–2237.

- Parmar V.M., Schroder M. Sensing endoplasmic reticulum stress // *Adv Exp Med Biol.* 2012. Vol. 738. P. 153–168.
- Patten S.A. et al. Fishing for causes and cures of motor neuron disorders // *Dis. Model. Mech.* 2014. Vol. 7. № 7. P. 799–809.
- Paulsson J.F. et al. Real-time monitoring of apoptosis by caspase-3-like protease induced FRET reduction triggered by amyloid aggregation // *Exp. Diabetes Res.* 2008. Vol. 2008. P. 865850.
- Pereira G.R.C., Azevedo Abrahim Vieira B. De, Mesquita J.F. De. Comprehensive in silico analysis and molecular dynamics of the superoxide dismutase 1 (SOD1) variants related to amyotrophic lateral sclerosis // *PLoS One.* 2021. Vol. 16. № 2. P. e0247841.
- Perez E.E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26. № 7. P. 808–816.
- Petrov D. et al. ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? // *Front. Aging Neurosci.* 2017. Vol. 9. P. 68.
- Philips T., Rothstein J.D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis // *Current Protocols in Pharmacology.*, 2015. 69:5.67.1-5.67.21. doi:10.1002/0471141755.ph0567s69
- Polymenidou M. et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43 // *Nat. Neurosci.* 2011. Vol. 14. № 4. P. 459–68.
- Prasad R., Jayachandra D.R., Nugehally B. Two Decades-Long Journey from Riluzole to Edaravone : Revisiting the Clinical Pharmacokinetics of the Only Two Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapeutics // *Clin. Pharmacokinet.* 2018. Vol. 57. P. 1385–1398.
- Puchalski R.B. et al. Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors // *Neuron.* 1994. Vol. 13. № 1. P. 131–147.
- Puls I. et al. Mutant dynactin in motor neuron disease // *Nat. Genet.* 2003. Vol. 33. № 4. P. 455–456.
- Raab S. et al. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation // *Stem Cells Int.* 2014. Vol. 2014. P. 768391.

- Rao M.S., Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine // *J. Cell. Biochem.* 2012. Vol. 113. № 10. P. 3061–3068.
- Raoul C. et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS // *Nat. Med.* 2005. Vol. 11. № 4. P. 423–428.
- Ravits J. et al. Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis // *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 2013. Vol. 14. № sup1. P. 5–18.
- Re D.B. et al. Necroptosis Drives Motor Neuron Death in Models of Both Sporadic and Familial ALS // *Neuron.* 2014. Vol. 81. № 5. P. 1001–1008.
- Richardson K. et al. The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. № 6. P. e68256.
- Rives M.L. et al. Crosstalk between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration // *EMBO J.* 2009. Vol. 28. № 15. P. 2195–2208.
- Rojas F. et al. Reactive oxygen species trigger motoneuron death in non-cell-autonomous models of ALS through activation of c-Abl signaling // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. Vol. 9. P. 203.
- Rubeis S. De, Buxbaum J.D. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity // *Hum. Mol. Genet.* 2015. Vol. 24. № R1. P. R24–R31.
- Rudzinski L.A. et al. New antiepileptic drugs: focus on ezogabine, clobazam, and perampanel // *J. Investig. Med.* 2016. Vol. 64. № 6. P. 1087–1101.
- Ryu H.-H. et al. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons // *Neurobiol. Aging.* 2014. Vol. 35. № 12. P. 2822–2831.
- Ryu H. et al. Differential expression of c-Ret in motor neurons versus non-neuronal cells is linked to the pathogenesis of ALS // *Lab. Investig.* 2011. Vol. 91. № 3. P. 342–352.
- Sabariegos R. et al. Fluorescence resonance energy transfer-based assay for characterization of hepatitis C virus NS3-4A protease activity in live cells // *Antimicrob.*

- Agents Chemother. 2009. Vol. 53. № 2. P. 728–734.
- Sabatelli M., Conte a, Zollino M. Clinical and genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis // Clin. Genet. 2013. Vol. 83. № 5. P. 408–416.
- Sadanandom A., Napier R.M. Biosensors in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. Vol. 13. № 6. P. 736–743.
- Saijo K., Glass C.K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease // Nat. Rev. Immunol. 2011. Vol. 11. № 11. P. 775–787.
- Saito K. et al. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging // Nat. Commun. 2012. Vol. 3. № May. P. 1262–1269.
- Sakowski S.A. et al. Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish // Mol. Neurodegener. 2012. Vol. 7. P. 44.
- Savić N., Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing // Transl. Res. 2016. Vol. 168. P. 15–21.
- Schlaeger T.M. et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. // Nat. Biotechnol. 2015. Vol. 33. № 1. P. 58–63.
- Schwank G. et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. // Cell Stem Cell. 2013. Vol. 13. № 6. P. 653–658.
- Schwarzländer M. et al. Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors // Antioxid. Redox Signal. 2016. Vol. 24. № 13. P. 680–712.
- Seeburg P.H. A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations // Neuron. 2002. Vol. 35. № 1. P. 17–20.
- Shao H. et al. A system mathematical model of a cell–cell communication network in amyotrophic lateral sclerosis // Mol. Biosyst. 2013. Vol. 9. № 3. P. 398–406.
- Shi P. et al. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2010. Vol. 1802. № 1. P. 45–51.
- Smith R.A. et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease // J. Clin. Invest. 2006. Vol. 116. № 8. P. 2290–2296.
- Song F., Stieger K. Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair

- of Double-Strand Breaks // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2017. Vol. 7. P. 53–60.
- Soo K.Y., Atkin J.D. Autophagy dysregulation by mutant fused in sarcoma--implications for amyotrophic lateral sclerosis // *Cell Death Dis*. 2015. Vol. 6. № 10. P. e1945.
- Soreq L. et al. Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging // *Cell Rep*. 2017. Vol. 18. № 2. P. 557–570.
- Souslova E.A. et al. Single fluorescent protein-based Ca²⁺ sensors with increased dynamic range // *BMC Biotechnol*. 2007. Vol. 7. P. 37.
- St-Pierre F., Chavarha M., Lin M.Z. Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators // *Curr Opin Chem Biol*. 2015. Vol. 27. P. 31–38.
- Sun N. et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2009. Vol. 106. № 37. P. 15720–15725.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126. № 4. P. 663–676.
- Takalo M. et al. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases // *Am. J. Neurodegener. Dis*. 2013. Vol. 2. № 1. P. 1–14.
- Takanaga H., Chaudhuri B., Frommer W.B. GLUT1 and GLUT9 as the major contributors to glucose influx in HEPG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor // *Biochim Biophys Acta*. 2008. Vol. 1778. № 4. P. 1091–1099.
- Takemoto K. et al. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects // *J. Cell Biol*. 2003. Vol. 160. № 2. P. 235–243.
- Tanaka K., Matsuda N. Proteostasis and neurodegeneration: The roles of proteasomal degradation and autophagy // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 2014. Vol. 1843. № 1. P. 197–204.
- Tateno M. et al. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3 // *Hum. Mol. Genet*. 2009. Vol. 18. № 5. P. 942–955.
- Taylor J.M., Crack P.J. Impact of oxidative stress on neuronal survival // *Clin. Exp*.

- Pharmacol. Physiol. 2004. Vol. 31. № 7. P. 397–406.
- Terrasso A.P. et al. Human neuron-astrocyte 3D co-culture-based assay for evaluation of neuroprotective compounds // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2017. Vol. 83. P. 72–79.
- Thomsen G.M. et al. Delayed Disease Onset and Extended Survival in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis after Suppression of Mutant SOD1 in the Motor Cortex // *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34. № 47. P. 15587–15600.
- Thomson J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. // *Science*. 1998. Vol. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Tripathi P. et al. Reactive Astrocytes Promote ALS-like Degeneration and Intracellular Protein Aggregation in Human Motor Neurons by Disrupting Autophagy through TGF- β 1 // *Stem Cell Reports*. 2017. Vol. 9. № 2. P. 667–680.
- Tsai M.T. et al. Real-time monitoring of human enterovirus (HEV)-infected cells and anti-HEV 3C protease potency by fluorescence resonance energy transfer // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53. № 2. P. 748–755.
- Tsien R.Y. Fluorescent probes of cell signaling // *Annu. Rev. Neurosci.* 1989. Vol. 12. P. 227–253.
- Tyas L. et al. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer // *EMBO Rep.* 2000. Vol. 1. № 3. P. 266–270.
- Uchida A. et al. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43 // *Brain*. 2012. Vol. 135. № 3. P. 833–846.
- Urushitani M. et al. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 83. № 5. P. 1030–42.
- Valentine J.S., Hart P.J. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100. № 7. P. 3617–3622.
- Vargas M.R., Johnson D.A., Johnson J.A. Decreased glutathione accelerates neurological deficit and mitochondrial pathology in familial ALS-linked hSOD1(G93A) mice model. // *Neurobiol. Dis.* 2011. Vol. 43. № 3. P. 543–551.
- Vincenz C., Kerppola T.K. Different polycomb group CBX family proteins associate

- with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. № 43. P. 16572–16577.
- Voigt A. et al. TDP-43-Mediated Neuron Loss In Vivo Requires RNA-Binding Activity // PLoS One. 2010. Vol. 5. № 8. P. e12247.
- Wadkin L.E. et al. Dynamics of single human embryonic stem cells and their pairs: a quantitative analysis // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 570.
- Walia A., Waadt R., Jones A.M. Genetically Encoded Biosensors in Plants: Pathways to Discovery // Annu. Rev. Plant Biol. 2018. Vol. 69. № 1. P. 497–524.
- Wang H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // Cell. 2013. Vol. 153. № 4. P. 910–918.
- Wang L. et al. Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse // Hum. Mol. Genet. 2009. Vol. 18. № 9. P. 1642–1651.
- Wang P. et al. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in neurodevelopment // Mol. Autism. 2015. Vol. 6. P. 55.
- Warren L. et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA // Cell Stem Cell. 2010. Vol. 7. № 5. P. 618–630.
- Watanabe T. et al. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. Vol. 268. № 3. P. 1597–1604.
- Watson M.R. et al. A *Drosophila* Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Motor Neuron Damage by Human SOD1 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. № 36. P. 24972–24981.
- Wegner S. V. et al. Dynamic Copper(I) Imaging in Mammalian Cells with a Genetically Encoded Fluorescent Copper(I) Sensor // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132. № 8. P. 2567–2569.
- Weiduschat N. et al. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique // Neurosci. Lett. 2014. Vol. 570. P. 102–107.

- Wiethoff S. et al. Using human induced pluripotent stem cells to model cerebellar disease: Hope and hype // *J. Neurogenet.* 2015. Vol. 29. № 2–3. P. 95–102.
- Wijesekera L.C., Leigh P.N. Amyotrophic lateral sclerosis // *Orphanet J. Rare Dis.* 2009. Vol. 4. P. 3.
- Xu X. et al. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. № 8. P. 2034–2035.
- Yaginuma H. et al. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 6522.
- Yamanaka K. et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis // *Nat. Neurosci.* 2008. Vol. 11. № 3. P. 251–253.
- Ye L. et al. The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiac Disease Modeling and Drug Testing // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2018. Vol. 11. P. 366-374.
- Ye S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. № 17. P. e88.
- Yokota T. et al. siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 314. № 1. P. 283–291.
- Yoshino H., Kimura A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study) // *Amyotroph. Lateral Scler.* 2006. Vol. 7. № 4. P. 247–251.
- Young A.B. Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come! // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. № 41. P. 12722–12728.
- Yu D. et al. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. P. 3626.
- Yu D. et al. A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling *in vivo* // *Nat. Methods.* 2015. Vol. 12. № 8. P. 763–765.
- Yu J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells // *Science.* 2007. Vol. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Zhang J. et al. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of

substrate tethering // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98. № 26. P. 14997–15002.

Zhang K. et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport // *Nature*. 2015. Vol. 525. № 7567. P. 56–61.

Zhang X. et al. mTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Autophagy*. 2014. Vol. 10. № 4. P. 588–602.

Zhang Y. et al. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse // *Neuron*. 2016. Vol. 89. № 1. P. 37–53.

Zhao T. et al. Differential HspBP1 expression accounts for the greater vulnerability of neurons than astrocytes to misfolded proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. Vol. 114. № 37. P. e7803–7811.

Zhu P. et al. Silencing and Un-silencing of Tetracycline-Controlled Genes in Neurons // *PLoS One*. 2007. Vol. 2. № 6. P. e533.

Приложение 1. Характеристика первичных и вторичных антител, используемых при иммунофлуоресцентном окрашивании

Антитела	Источник	Каталожный номер	Тип	Разведение
Первичные антитела				
Маркеры плюрипотентных клеток				
Анти-OCT4	BD Transduction Lab	611202	Мыши моноклональные	1:200
Анти-NANOG	Abcam	ab62734	Кролика поликлональные	1:200
Анти-SOX2	Cell Signaling	3579	Кролика поликлональные	1:400
Анти-SSEA4	Abcam	ab16287	Мыши моноклональные	1:50
Анти-TRA-1-60	Abcam	ab16288	Мыши моноклональные	1:200
Маркеры производных экто-, мезо- и энтодермы				
Анти-NF200	Sigma	N4142	Кролика поликлональные	1:500
Анти-фибронектин	Abcam	ab23750	Кролика поликлональные	1:500
Анти-αSMA	Dako		Мышиные моноклональные IgG2a	
Анти-AFP	R&D	MAV1369	Мышиные моноклональные	1:1000
Анти-CK18	EMD Millipore	MAV3236	Мышиные моноклональные IgG1	1:200
Маркеры зрелых моторных нейронов				
Анти-Tuj1	Biolegend	801213	Мышиные моноклональные IgG2	1:1000
Анти-НВ9	EMD Millipore	ABN174	Кролика поликлональные	1:1000
Анти-ISL1	Abcam	ab109517	Кролика поликлональные	1:500
Анти-ChAT	EMD Millipore	AB144P	Козы поликлональные	1:100
Вторичные антитела				
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11008	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11011	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti mouse	Thermo Fisher Scientific	A11029	Козы поликлональные	1:400

IgG (H+L)				
Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11004	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgM	Thermo Fisher Scientific	A21043	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 488 rabbit anti goat IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11078	Кролика поликлональные	1:400

Приложение 2. Последовательности олигонуклеотидов, зондов и праймеров, использованные в работе

Название	Последовательность, 5'-3'	Назначение
Олигонуклеотиды		
crisprRNA_AAVS1	GUCACCAAUCCUGUCCCUAGGUU UUAGAGCUAUNCU	crisprРНК для внесения двунитевых разрывов в локус <i>AAVS1</i>
crisprRNA_SOD1-4	GACUGCUGACAAAGAUGGUGGUU UUAGAGCUAUGCU	crisprРНК для внесения двунитевых разрывов в 4 экзон гена <i>SOD1</i> . Внесение замены с.272A>C
crisprRNA_SOD1-8	GCAGAUGACUUGGGCAAAGGGUU UUAGAGCUAUGCU	crisprРНК для внесения двунитевых разрывов в 5 экзон гена <i>SOD1</i> . Внесение замены с.382G>C
D90A-ssODN	A*G*A*TCACAGAATCTTCAATAGAC ACGTCGGCCACACCATCTTTGGCAG CAGTCACATTGCCCAAGTCTCCAAC ATGCCTAA TAATGAA*A*A*A	Матрица для внесения замены с.272A>C в ген <i>SOD1</i> посредством гомологичной рекомбинации. * - Фосфотиоатные связи
G127R-ssODN	G*T*T*TCCTGTCTTTGTACTTTCTTCAT TTCCACCTTTGCGCAAGTCATCTGC TTTTTCATGAACCTGTAAAAAATTT TAAGAAGATAAC*T*T*T	Матрица для внесения замены с.382G>C в ген <i>SOD1</i> посредством гомологичной рекомбинации. * - Фосфотиоатные связи
Зонды для количественной ПЦР в реальном времени		
G127G-WT-FAM	FAM-CCTTTGCCCAAGTCATCTGC- BHQ1	Детекция аллеля дикого типа с помощью количественной ПЦР в реальном времени
G127R-mut-VIC	VIC-CCTTTGCGCAAGTCATCTGC- BHQ2	Детекция аллеля с заменой с.382G>C с помощью количественной ПЦР в реальном времени
Праймеры		
T7-14-F	ATATCAGAGGCCTTGGGACATAG	Аmplification участка 4 экзона гена <i>SOD1</i>
T7-14-R	TGAACTGCAAGTACAGTTTATCTGG	
T15-16-F	TGTCTTTGCAACACCAAGAAA	Аmplification участка 5 экзона гена <i>SOD1</i>
T15-16-R	TTACAGGCTTGAATGACAAA	
SOD1-mRNA-full-F	GGAAGCATTAAGGACTGAC	Аmplification полноразмерной формы мРНК <i>SOD1</i>
SOD1-mRNA-full-R	TCTTCATTTCCACCTTTGC	
B2M-F	TAGCTGTGCTCGCGCTACT	Ген-референс для

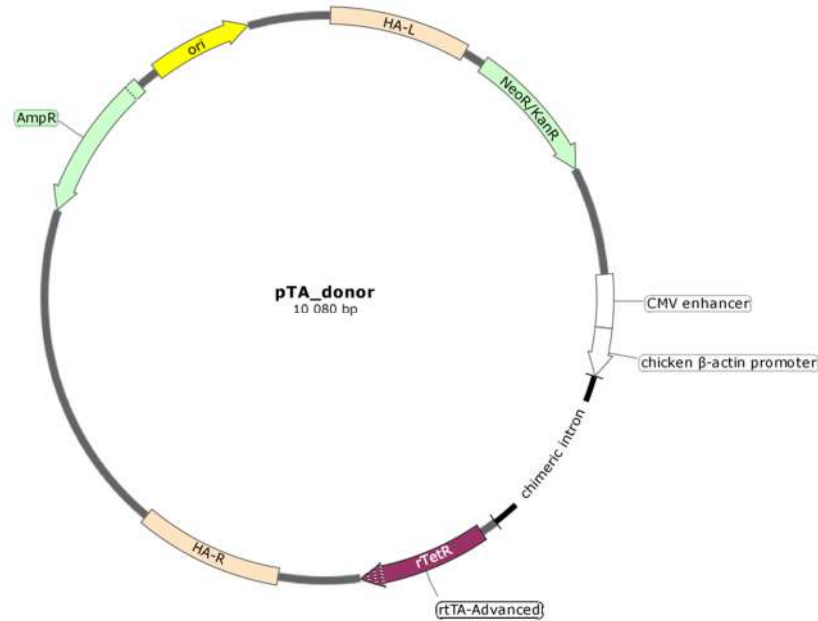
B2M-R	TCTCTGCTGGATGACGTGAG	количественной ПЦР в реальном времени
RPL13-F	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	Ген-референс для количественной ПЦР в реальном времени
RPL13-R	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	
GAPDH-F	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	Ген-референс для количественной ПЦР в реальном времени
GAPDH-R	CTCCACGACGTA CT CAGCG	
OCT4-F	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG	Экспрессия маркеров плюрипотентных клеток
OCT4-R	GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA	
SOX2-F	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	
SOX2-R	AACCCCAAGATGCACAAC TC	
NANOG-F	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC	
NANOG-R	CGGAAGATTCCCAGTCGGGTT CACC	
HB9-F	GTCCACCGCGGGCATGATCC	Экспрессия маркеров моторных нейронов
HB9-R	TCTTCACCTGGGTCTCGGTGAGC	
CHAT-F	GGAGGCGTGGAGCTCAGCGACACC	
CHAT-R	CGGGGAGCTCGCTGACGCAGTCTG	
ISL-F	AGCAGCCCAATGACAAAAC T	
ISL-R	CTGAAA AATTGACCAGTTGCTG	
Myco-F	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	Детекция контаминации микоплазмой
Myco-R	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	
EBNA-F	TTCCACGAGGGTAGTGAACC	Детекция встройки эписом к геном
EBNA-R	TCGGGGGTGTTAGAGACAAC	
SOD1-8-F	GTAGTGATTACTTGACAGCC	Поиск клонов ИПСК с заменой G127R в гене SOD1 с помощью количественной ПЦР в реальном времени
SOD1-8-R	CAATTACACCACAAGCCAA	
AAVS1_WT-F	CTCTGGCTCCATCGTAAGCAA	Аmplification участка локуса <i>AAVS1</i> дикого типа, без целевой встройки
AAVS1_WT-R	CCCAAAGTACCCCGTCTCCC	
roGFP2-qPCR-F2	TAGACGTTGTGGCAGTTGTAG	Экспрессия биосенсора
roGFP2-qPCR-R2	GCTGAAGGGCATCGACTT	
rtTA-qPCR-F	GGACAGGCATCATA C CCACTT	Экспрессия транскриптора
rtTA-qPCR-R	AGAGCACAGCGGAATGACTT	
HA_L-OUT	CCGGACCACTTTGAGCTCTAC	Определение правильности позиции встройки в локус <i>AAVS1</i>
Neo_in-R	GCCCAGTCATAGCCGAATAG	+ HA_L_OUT, определение позиции встройки транскриптора
Puro_in-R	AGGCGCACCGTGGGCTTGTAC	+ HA_L_OUT, определение позиции встройки биосенсора
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	+Neo_in_R, определение наличия

		дополнительных нецелевых встроек плазмиды AAVS1-Neo- M2rtTA в геном
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	+Puro_in_R, определение наличия дополнительных нецелевых встроек плазмид-биосенсоров в геном
D90A-inner-F	CTTGGGCAATGTGACTGCCGA	Детекция замены с.272A>C в гене <i>SOD1</i> с помощью Tetra-primer ARMS PCR
D90A-inner-R	ATCGGCCACACCATCTTCGG	
D90A-outer-F	TGATGTTTAGTGGCATCAGCCCTAATC	
D90A-outer-R	GAAACCGCGACTAACAATCAAAGTG AA	

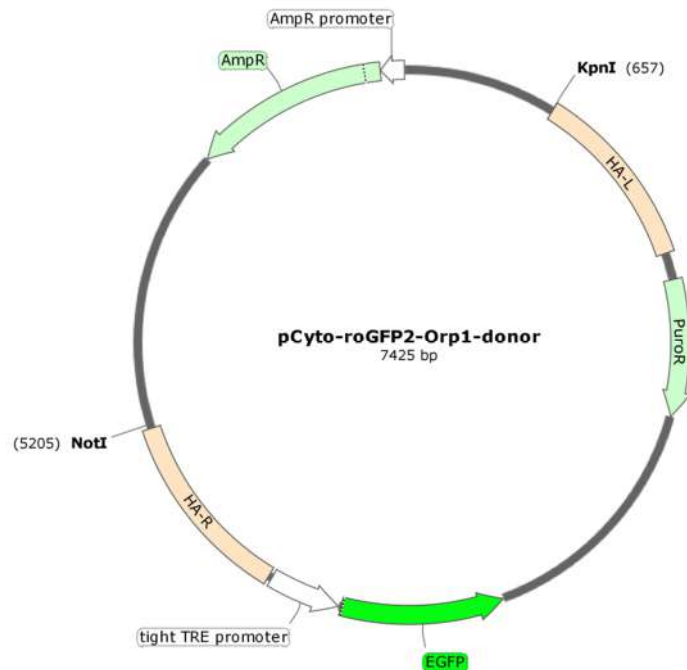
Приложение 3. Карты плазмид-доноров для гомологичной рекомбинации

На изображениях схематично представлены донорные плазмиды, использованные в работе. Отображены основные компоненты плазмид: плечи гомологии к локусу *AAVS1*, гены устойчивости к неомицину/пурамицину, элементы Tet-On-системы для доксициклин-управляемой экспрессии трансгенов, функциональные элементы биосенсоров. Все карты были составлены в приложении SnapGene®.

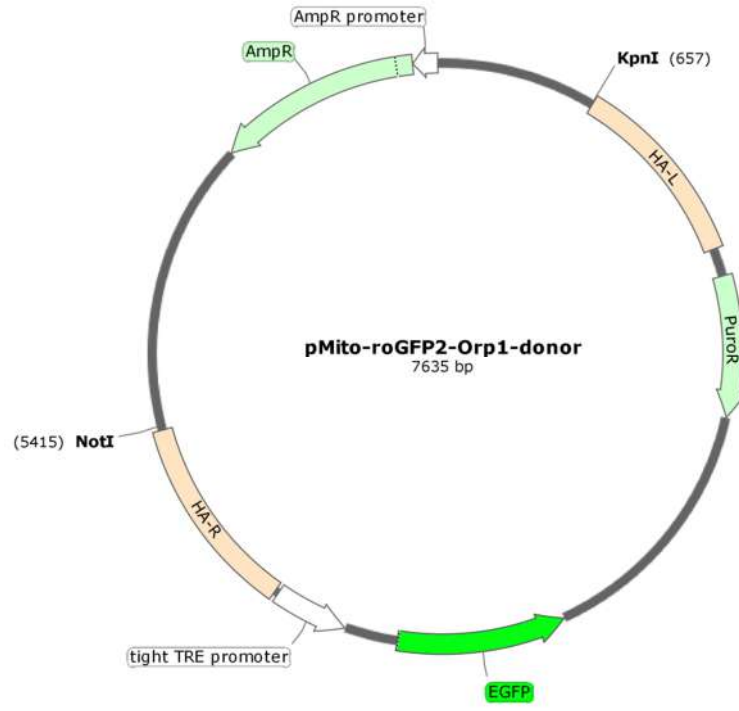
а – AAVS1-Neo-M2rtTA (# Addgene 60843). Донорная плазмида, предназначенная для встройки последовательности трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии.



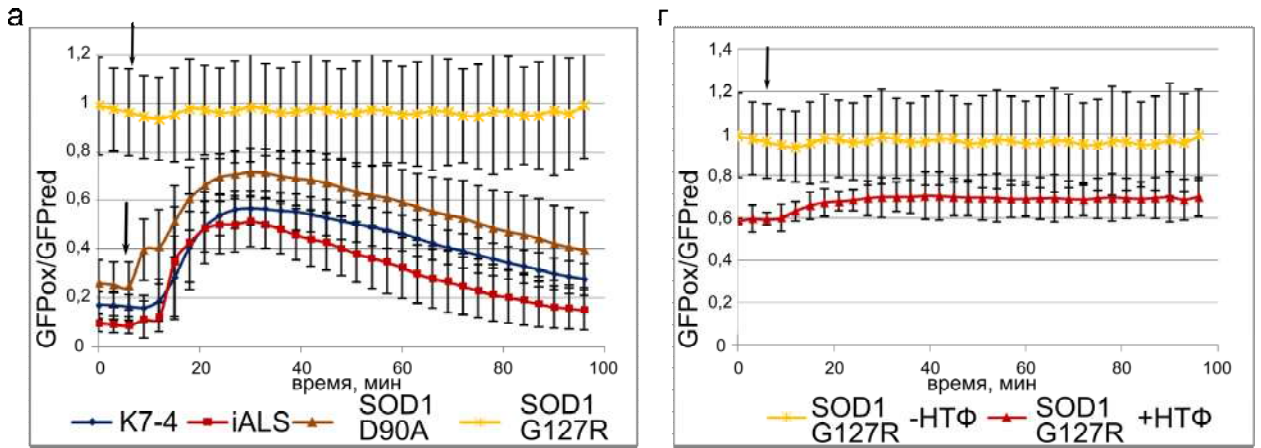
б - pCyto-roGFP2-Orp1-donor. Донорная плазмида, предназначенная для встройки последовательности сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 в локус *AAVS1*.



в – pMito-roGFP2-Orp1-donor. Донорная плазмида, предназначенная для встройки последовательности сенсора Mito-roGFP2-Orp1 в локус *AAVS1*.



Приложение 4. Рисунок 23 (Частично). Реакция биосенсора Cyto-roGFP2-Orp1 моторных нейронов линий K7-4, iALS, SOD1-D90A, SOD1-G127R в ответ на добавление 10 мкМ H_2O_2 (С планками погрешностей)



а – график изменения соотношения GFPox/GFPred в реальном времени после добавления H_2O_2 (обозначено стрелкой); г – график изменения соотношения GFPox/GFPred в реальном времени после добавления H_2O_2 к моторным нейронам линии SOD1-G127R, культивируемым в стандартных условиях (оранжевый график), и в присутствии трофических факторов (красный график). N=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего.