

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

На правах рукописи

ВАЛЕТДИНОВА КАМИЛА РОБЕРТОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ
АТРОФИИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Закиян Сурен Минасович

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Спинальная мышечная атрофия.....	13
1.1.1. Общая характеристика и классификация	13
1.1.2. Основы этиопатогенеза.....	14
1.1.2.1. Гены <i>SMN1</i> и <i>SMN2</i>	14
1.1.2.2. Функции белка SMN.....	18
1.1.3. Основные модели СМА в системе <i>in vivo</i>	21
1.1.4. Молекулярно-генетическая диагностика СМА	24
1.2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека как основа для создания клеточных моделей спинальной мышечной атрофии.....	28
1.2.1. Открытие феномена индуцированной плюрипотентности.....	28
1.2.2. Способы репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию	33
1.2.3. Методы, используемые для оценки плюрипотентностного статуса стволовых клеток человека	36
1.2.4. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны.....	43
1.2.5. Изучение клеточных моделей СМА.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1. Материалы.....	53
2.1.1. Культуральные среды, сыворотки, антибиотики, добавки	53
2.1.2. Факторы роста, низкомолекулярные активаторы/ингибиторы сигнальных путей	53

2.1.3. Реактивы.....	54
2.1.4. Ферменты	54
2.1.5. Наборы.....	54
2.1.6. Растворы и буферы.....	55
2.2. Методы.....	55
2.2.1. Методы работы с клеточными культурами	55
2.2.1.1. Состав сред и условия культивирования.....	55
2.2.1.2. Получение культур клеток.....	57
2.2.1.2.1. Получение ИПСК из фибробластов кожи человека	57
2.2.1.2.2. Получение митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши.....	58
2.2.1.2.3. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны	59
2.2.1.3. Замораживание клеток	60
2.2.1.4. Размораживание клеток.....	61
2.2.2. Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы.....	61
2.2.3. Спонтанная дифференцировка ИПСК <i>in vitro</i>	61
2.2.4. Спонтанная дифференцировка ИПСК <i>in vivo</i>	62
2.2.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание	63
2.2.6. Проточная цитофлуориметрия.....	65
2.2.7. Анализ кариотипа.....	65
2.2.8. Выделение РНК	67
2.2.9. Синтез кДНК методом обратной транскрипции.....	67
2.2.10. Полимеразная цепная реакция	68

2.2.11. ПЦР в реальном времени для определения количества копий эписом на клетку	71
2.2.12. Мультиплексная ПЦР в реальном времени для детекции количества копий гена <i>SMN2</i>	72
2.2.13. Электрофорез ДНК в агарозном геле	73
2.2.14. Рестрикционный анализ	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	75
3.1. Определение оптимальной концентрации эписомной ДНК, используемой для репрограммирования	75
3.2. Репрограммирование пациент-специфичных фибробластов	76
3.3. Профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности	79
3.4. Спонтанная дифференцировка ИПСК в эмбрионидных тельцах	81
3.5. Тератомный тест	84
3.6. Картирование полученных линий ИПСК	87
3.7. Характеристика генотипа пациент-специфичных ИПСК	88
3.8. Анализ копийности эписом в полученных линиях ИПСК	91
3.9. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102
ПРИЛОЖЕНИЕ	132

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАС – боковой амиотрофический склероз

ВКМ – внутренняя клеточная масса

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

МН – моторные нейроны

мРНК – матричная РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

мяРНП – малые ядерные рибонуклеопротеиды

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПСК – плюрипотентные стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

РНК – рибонуклеиновая кислота

СМА – спинальная мышечная атрофия

тпн – тысяч пар нуклеотидов

ТРГ - тиреотропин-рилизинг-гормон

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ЭФМ – эмбриональные фибробласты мышцы

СНАТ - холин ацетилтрансфераза (choline acetyltransferase)

DAPI - 4',6'-диамидино-2-фенилининдол

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium)

GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein)

GSK-3 β – гликоген синтаза киназа 3 бета (glycogen synthase kinase-3 beta)

HB9 – homeobox 9

ISL1 – insulin gene enhancer

KLF4 - kruppel-like factor 4

MAP2 – microtubule-Associated Protein 2

MLPA - мультиплексная амплификация лигированных зондов (multiplex ligation dependent probe amplification)

OCT4 - octamer-binding transcription factor 4

OLIG2 - oligodendrocyte transcription factor 2

PAX6 - paired box protein 6

PBS - фосфатный буфер (phosphate-buffered saline)

SCNT – технология пересадки ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer)

SMN - survival of motor neuron

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)

SOX1, 2 - SRY (sex determining region Y)-box 1, 2

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Спинальная мышечная атрофия (СМА) объединяет группу наследственных заболеваний, отличительной особенностью которых является прогрессирующая дегенерация периферических моторных нейронов, что приводит к развитию симметричного вялого паралича поперечно-полосатой мускулатуры. Наиболее часто встречающейся формой СМА является проксимальная СМА I-IV типов (Munsat, Davies, 1992). При этом наиболее тяжелыми являются I и II тип, развивающиеся в раннем детском возрасте (Finkel et al., 2014). В среднем 1 из 6000—10000 детей рождается со СМА, при этом около 50% больных детей не доживают до двух лет (Prior et al., 2010). Генетической причиной этого заболевания являются мутации в гене *SMN1* (Lefebvre et al., 1995). Причем к развитию патологии приводят только те мутации (преимущественно делеции), которые затрагивают 7 экзон данного гена. Основным модифицирующим фактором при СМА, оказывающим влияние на степень проявления и скорость развития симптомов, является количество копий гена *SMN2* (Monani et al., 1999). Чем больше копий *SMN2*, тем мягче течение заболевания. Эффекты мутаций в гене *SMN1* до конца не изучены, что затрудняет поиск оптимального метода лечения. Поэтому актуальной задачей является получение адекватной модельной системы СМА.

Классические модельные объекты биологии – нематода, дрозофила, *Danio rerio*, мышшь широко используются для изучения механизмов этиопатогенеза СМА, тестирования лекарственных соединений и разработки подходов к лечению данного заболевания (Valetdinova et al., 2015). Однако на генетическом и фенотипическом уровне подобные модели не соответствуют тому, что наблюдается при СМА у человека. Это обусловлено тем, что перечисленные организмы отличаются по своей генетике, физиологии,

морфологии от человека и клеток его тела. Одним из ведущих отличий является то, что в геноме этих модельных объектов присутствует только один ген *Smn*, эквивалентный гену *SMN1* человека. Данный факт требует усложнения естественной системы модельного организма – внедрения дополнительных копий трансгена *SMN2* человека (Edens et al., 2015).

Поэтому в настоящее время активно развивается направление, основанное на получении клеточных моделей СМА с помощью дифференцированных производных пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека (Ebert et al., 2009, Sareen et al., 2012). Моторные нейроны, дифференцированные из ИПСК и воспроизводящие фенотип данного заболевания, могут быть использованы в исследованиях патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели двигательных нейронов, для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики лечения не только СМА, но и повреждений спинного мозга (Lunn et al., 2011, Corti et al., 2012, Amemori et al., 2013). В перспективе данная технология может стать основой для заместительной клеточной терапии поврежденных нервных клеток, а также компонентов микроокружения, вырабатывающих нейротрофические факторы и перерабатывающих токсические метаболиты. Однако для этого необходимо решить ряд вопросов, касающихся эффективной направленной дифференцировки ИПСК в моторные нейроны определенного типа, масштабирования экспериментов для проведения фармакологических исследований, разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, а также методов трансплантации нервных клеток и/или их предшественников, способных восполнить функции погибших клеток спинного мозга. И первым этапом на пути к решению указанных проблем является создание новых клеточных моделей СМА, охватывающих весь спектр патологических проявлений данного заболевания на молекулярном и клеточном уровне.

Цели и задачи исследования

Цель работы - получить и охарактеризовать модельную систему спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Задачи:

1. Репрограммировать фибробласты от пациентов со спинальной мышечной атрофией I, II типа и здорового человека к плюрипотентному состоянию.
2. Охарактеризовать полученные линии с использованием стандартных тестов на плюрипотентность.
3. Провести направленную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в моторные нейроны и охарактеризовать полученные клетки.

Научная новизна работы

Получена новая модельная система, состоящая из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типов и здорового человека. При этом репрограммирование к плюрипотентному состоянию осуществлено с помощью эписомных векторов – практически не интегрирующихся в геном кольцевых молекул ДНК, обеспечивающих временную экспрессию факторов репрограммирования. Плюрипотентный статус полученных клеточных линий был подтвержден с помощью целого ряда тестов, включая формирование тератом – аналог самого строгого теста на химеризм, который невозможно провести для плюрипотентных клеток человека. Проведена направленная дифференцировка пациент-специфичных клеточных линий в моторные нейроны, демонстрирующие экспрессию маркеров зрелых двигательных нейронов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученная в данной работе модельная система может быть использована для комплексного изучения молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития проксимальной спинальной мышечной атрофии, проведения фармакологических и токсикологических исследований.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, полученные из фибробластов пациентов со спинальной мышечной атрофией с помощью эписомных векторов, демонстрируют генотип больных и свойства самообновления и плюрипотентности.
2. Моторные нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека пациентов со спинальной мышечной атрофией, являются адекватной модельной системой для изучения данного заболевания.

Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Определение числа копий гена *SMN2* в полученных линиях ИПСК осуществлялось к.б.н. А.В. Киселевым. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводился совместно с к.б.н. А.И. Шевченко и к.б.н. Е.В. Григорьевой. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа осуществлялся к.б.н. Ю.В. Мининой. Обработка материала тератом и гистологический анализ осуществлялся к.б.н. Е.А. Кизиловой и Л.А. Чугаевой.

Апробация работы

Результаты работы были представлены

1. **Валетдинова К.Р.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Модельные системы болезней моторных нейронов на основе плюрипотентных стволовых клеток человека // Материалы VIII всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов. Новосибирск. 2015. С. 21.
2. **Валетдинова К.Р.**, Устьянцева Е.И., Медведев С.П., Закиян С.М. Получение модельных систем болезней моторных нейронов на основе плюрипотентных стволовых клеток человека // 2-й национальный Конгресс по регенеративной медицине. Материалы конгресса. Москва. 2015. С. 38.
3. **Валетдинова К.Р.**, Григорьева Е.В., Закиян С.М. Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека // Сборник материалов форума «Биомедицина-2016». Новосибирск. 2016. С. 15.

По теме диссертации опубликованы две работы.

1. **Валетдинова К.Р.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств // Acta Naturae. 2015. Т.7. №1(24). С. 92-109.
2. Григорьева Е.В., **Валетдинова К.Р.**, Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Медведев С.П., Мазурок Н.И., Маретина М.А., Куранова М.Л., Киселев А.В., Баранов В.С., Закиян С.М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии // Гены и клетки. 2016. Т. XI. № 2. С. 70-81.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах, содержит 21 рисунок и 7 таблиц.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю С.М. Закияну за поддержку и помощь при выполнении всех этапов настоящего исследования. Автор выражает особую признательность сотрудникам Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, и лично В.С. Баранову и М.С. Богачевой, за предоставление культур фибробластов от пациентов со СМА I и II типов, а также заведующей неврологическим отделением Детской городской больницы №22 города Санкт-Петербурга С.А. Стрекаловой за медицинское сопровождение работы. Автор благодарит за помощь А.И. Шевченко, И.С. Захарову, Е.В. Григорьеву, С.П. Медведева и весь коллектив лаборатории эпигенетики развития. Кроме того автор выражает благодарность Ждановой Н.С. и Жаркову Д.О. за ценные критические замечания и советы по написанию диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Спинальная мышечная атрофия

1.1.1. Общая характеристика и классификация

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся мышечной атрофией и слабостью, вызванной дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, реже двигательных ядер ствола головного мозга. В настоящее время выделяют 16 различных форм данного заболевания, обладающих выраженным клиническим полиморфизмом (Wee et al., 2010). В зависимости от локализации мышечной атрофии различают проксимальную и дистальную формы СМА, а в зависимости от типа наследования – аутосомно-доминантную, аутосомно-рецессивную и X-сцепленную формы данного заболевания. При этом наиболее распространенной формой является проксимальная аутосомно-рецессивная СМА, обусловленная мутациями в гене *SMN1* (Lefebvre et al., 1995). Около 95% мутаций составляют гомозиготные делеции седьмого экзона, в остальных случаях встречаются точечные мутации в гомозиготном состоянии, или в компаунде с делециями (Parsons et al., 1996).

Частота встречаемости СМА - 1 на 6000-10000 новорожденных, при этом частота носительства мутантного гена равна 1 на 40–50 (Emery, 1971). В зависимости от возраста манифестации и тяжести течения различают следующие типы этого заболевания (Kolb, Kassel, 2015):

- Тип 0 характеризуется наиболее ранним развитием, когда ребенок находится еще в организме матери. При этом отмечена резко сниженная двигательная активность плода. У новорожденных наблюдаются слабость и гипотония, явления дыхательной недостаточности. Больные дети, как правило, не доживают до полугода (Dubowitz, 1999).

- Тип I (болезнь Верднига–Гоффмана) – тяжелая форма, которая проявляется в течение первых шести месяцев жизни и характеризуется выраженными признаками паралича мышц конечностей и туловища, а также дыхательной мускулатуры, дети не могут самостоятельно сидеть и держать голову. Продолжительность жизни при этой форме заболевания, как правило, не превышает двух лет (Thomas, Dubowitz, 1994).

- Тип II – промежуточная форма, имеет более позднее начало, прогрессирует медленнее. Больные дети могут сидеть, но не способны самостоятельно стоять и ходить. Помимо этого болезнь сопровождается нарушениями в развитии костной ткани и суставов, выраженным сколиозом, слабостью межреберных мышц, заболеваниями органов дыхания. Продолжительность жизни пациентов снижена и составляет в среднем 15-20 лет.

- Тип III (болезнь Кугельберга–Веландер) – умеренная форма. Первые симптомы появляются после 18 месяцев. Поражаются преимущественно проксимальные мышцы нижних конечностей, мышцы верхних конечностей, как правило, остаются интактными. Продолжительность жизни больных снижена незначительно (Zerres et al., 1997).

- Тип IV – взрослая форма. В большинстве случаев начинается после 20–30 лет, не влияет существенно на продолжительность жизни. Проявляется слабостью проксимальной мускулатуры, произвольными, беспорядочными сокращениями отдельных групп мышечных волокон, а также снижением сухожильных рефлексов.

1.1.2. Основы этиопатогенеза

1.1.2.1. Гены *SMN1* и *SMN2*

С помощью различных методов генетического и физического картирования был определен локус СМА - 5q13 на длинном плече 5-ой

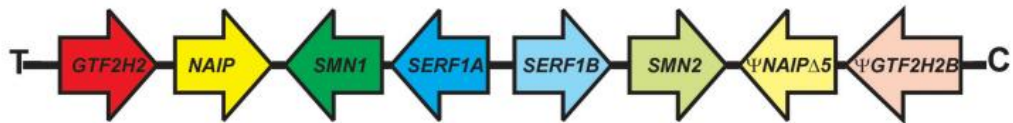
хромосомы (Melki et al., 1990, Morrison, 1996). В данном районе находится инвертированная дупликация, размером 500 тпн, которая встречается только у человека (Schmutz et al., 2004) (Рисунок 1А). В локусе 5q13 обнаружено 4 гена: *SMN1* (survival motor neuron 1), *NAIP* (neuronal apoptosis inhibitor protein), *GTF2H2A* (general transcription factor II), *SERF1A* (small EDRK-rich factor 1A), которые кодируют соответствующие белки, и 4 дублированные копии данных генов, которые либо совсем не отличаются по нуклеотидной последовательности от «предкового» гена, как *SERF1B*, либо отличаются несколькими заменами, как *SMN2*, либо же являются псевдогенами, как *ΨGTF2H2B* и *ΨNAIP15*. При этом к развитию СМА приводят только те мутации, которые затрагивают 7 экзон гена *SMN1*, но не *SMN2* и других генов данного района.

Последовательности генов *SMN1* и *SMN2* различаются лишь пятью нуклеотидами (Monani et al., 1999). Ген *SMN1* экспрессирует полноразмерный транскрипт, с которого считывается белок, способный к образованию функциональных комплексов, состоящих из нескольких субъединиц SMN. В случае гена *SMN2* от 80 до 90% мРНК не имеют в своем составе седьмого экзона в результате нарушения сплайсинга, вызванного заменой цитозина на тимин (*SMN2* с.850C>T) (Parsons et al., 1996).

Предложено две гипотезы, которые объясняют механизм данного нарушения. Первая основана на том, что 7 экзон генов *SMN1* и *SMN2* содержит семичленный мотив - экзонный энхансер сплайсинга, который привлекает фактор SF2/ASF (splicing factor 2/alternative splicing factor; фактор сплайсинга 2/альтернативный фактор сплайсинга), распознающий 5'-сайт сплайсинга, и способствует включению 7 экзона в зрелую мРНК. В случае, когда данный мотив прерван заменой C>T (C>U в молекуле РНК), SF2/ASF не привлекается, 3'-сайт сплайсинга также не распознается и 7 экзон не включается в зрелую мРНК (Cartegni, Krainer, 2002). Вторая гипотеза предполагает, что в результате замены C>U образуется экзонный сайленсер сплайсинга, который взаимодействует с hnRNP A1 (heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein A1; гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1) и препятствует включению 7 экзона в зрелую мРНК (Kashima, Manley, 2003). С укороченного транскрипта транслируется нестабильный белок SMN Δ 7, который не способен к образованию функциональных комплексов (Рисунок 1Б).

А



Б

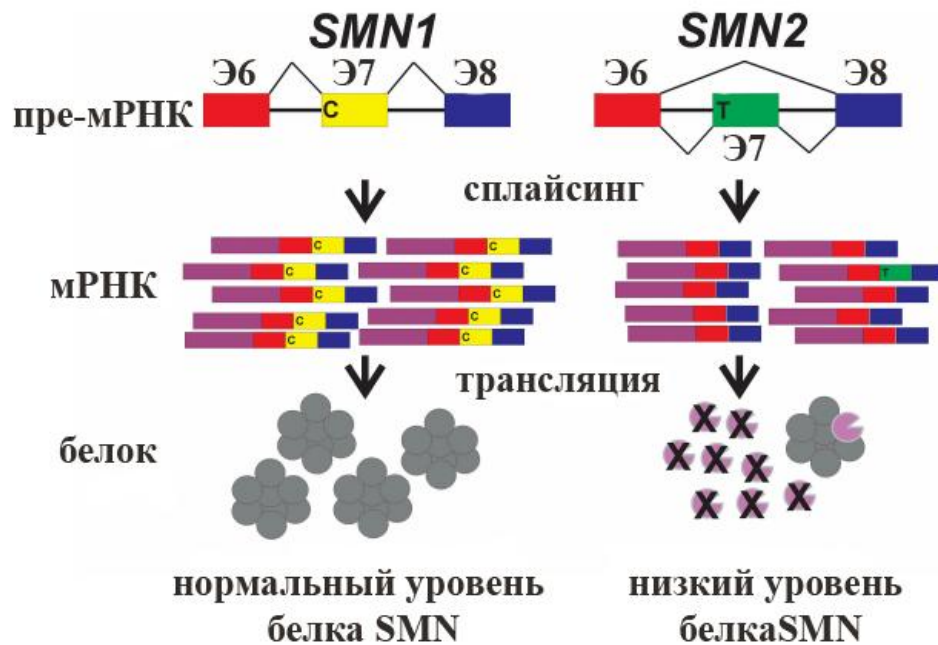


Рисунок 1. Организация локуса SMA и основные гены-модификаторы данного заболевания.

(А) Организация инвертированного дуплицированного локуса 5q13. С – центромерный конец, Т – теломерный конец (Butchbach, 2016). Пояснения даны в тексте.

(Б) Экспрессия генов *SMN1* и *SMN2* (Butchbach, 2016). Э6, Э7, Э8 – экзон 6, экзон 7, экзон 8. Пояснения даны в тексте.

Способность гена *SMN2* производить небольшое количество полноразмерных транскриптов (около 10-15%) делает его основным геном-модификатором SMA. Было показано, что число копий гена *SMN2*

коррелирует с тяжестью СМА (McAndrew et al., 1997). Большинство пациентов со СМА I типа имеют одну или две копии гена *SMN2*, пациенты со СМА II типа имеют три копии гена *SMN2*, больные СМА III типа имеют три или четыре копии *SMN2*. При наличии более четырех копий гена *SMN2* и гомозиготной делеции 7 экзона *SMN1*, как правило, наблюдается бессимптомное течение заболевания.

Одним из возможных механизмов, объясняющих увеличение количества копий гена *SMN2* в отсутствие *SMN1*, является конверсия генов *SMN1*→*SMN2* (Burghes, 1997). В этом случае *SMN1* содержит участок *SMN2*, по крайней мере, в 7 экзоне (DiDonato et al., 1997). В соответствии с данной гипотезой у больных СМА I типа делетирован участок, включающий 7 экзон *SMN1* обеих хромосом, у больных СМА II типа – только одной, а на другой хромосоме возникает конверсия *SMN1*→*SMN2*, у больных СМА III типа - конверсия *SMN1*→*SMN2* происходит на обеих хромосомах. Однако изредка встречаются пациенты со СМА II и III типа, имеющие две копии *SMN2*. У таких больных обнаружен редкий однонуклеотидный вариант в 7 экзоне *SMN2* (*SMN2* с.859G>C) (Vezain et al., 2010), который способствует включению данного экзона в большую часть транскриптов, чем это наблюдается у больных СМА I типа.

Увеличение количества копий гена *SMN2* на одной и той же хромосоме у больных СМА II и III типа также может происходить в результате незаконной рекомбинации или в результате двухстадийного процесса, включающего делецию *SMN1* с последующей дупликацией *SMN2* (Cusin et al., 2003). Гипотезу конверсии генов частично подтверждают случаи обнаружения «гибридного» гена *SMN1/SMN2* (Cusco et al., 2001). Однако убедительных доказательств в пользу той или иной гипотезы, объясняющей возрастание числа копий *SMN2*, по-прежнему не обнаружено. По-видимому, в данном случае имеет место повышенная генетическая нестабильность района 5q13, одной из причин которой является специфическая организация данного локуса и наличие повторяющихся последовательностей, также

повышающих риск делеций и перестроек. Кроме того, показано, что гомозиготная делеция *SMN2* обнаружена у 5-9% здоровых людей, следовательно, отсутствие данного гена в геноме не приводит к развитию какой-либо выраженной патологии (Gerard et al., 2000).

Другие гены-модификаторы оказывают меньший эффект на клиническое проявление СМА. Так, ряд авторов предполагает, что гены, расположенные на X-хромосоме, обладают протективным свойством. В подтверждение данной гипотезы приводят случаи бессимптомного течения заболевания у женщин, имеющих повышенную экспрессию *PLS3* (Oprea et al., 2008). Однако в некоторых семьях у детей женского пола отмечено более тяжелое течение заболевания, несмотря на высокий уровень мРНК *PLS3* (Bernal et al., 2011). По всей вероятности, модифицирующий эффект *PLS3* зависит от пола и возраста больного, при этом важное значение имеет пенетрантность.

Обнаружено, что большие делеции, затрагивающие соседние с *SMN1* гены, могут вызывать тяжелые формы течения данного заболевания (Sumner, 2007). Например, ген *NAIP* делетирован у 45% пациентов при СМА I типа, у 18% больных при СМА II и III типов (Roy et al., 1995). Ген *SERF1A* отсутствует у 90% больных СМА I типа, а ген *GTF2H2A* делетирован у 68% пациентов со СМА I типа.

1.1.2.2. Функции белка SMN

Гены *SMN1* и *SMN2* кодируют белок SMN, который присутствует как в цитоплазме, так и в ядре клеток различных тканей в составе SMN комплексов (Pellizzoni et al., 1998). Особенно много SMN обнаружено в двигательных нейронах спинного мозга (Coover et al., 1997). Белковый продукт генов *SMN1* и *SMN2* участвует в сплайсинге пре-мРНК, транспортировке зрелых мРНК и росте аксонов (Meister et al., 2001, Pellizzoni et al., 2002, McWhorter et al., 2003, Rossoll et al., 2003, Akten et al., 2011). SMN, как было показано,

способен взаимодействовать и связываться со многими белками (Eggert et al., 2006).

В настоящее время наиболее изученной является роль SMN как центрального компонента сложного комплекса, необходимого для сборки сплайсосомных частиц (Pellizzoni, 2007). Показано, что в ядре белок SMN участвует преимущественно в биогенезе богатых уридином мяРНП (малые ядерные рибонуклеопротеиды) (U1, U2, U4, U5, U11, U12), а в цитоплазме обеспечивает включение данного типа мяРНП в состав сплайсосомы - большого мяРНК-белкового комплекса, который катализирует сплайсинг пре-мРНК (Frugier et al., 2002, Paushkin et al., 2002). SMN комплекс необходим для формирования гептамерной кольцевой структуры, состоящей из 7 Sm белков (Pellizzoni et al., 2002), которые являются своего рода «РНК-шаперонами» - РНК-связывающими белками, обеспечивающими формирование необходимой пространственной структуры мяРНК. Помимо SMN, в состав данного комплекса входят другие белки - гемины 2-8 и UNRIP (Unr-interacting protein), каждый из которых, предположительно, играет определенную роль в биогенезе мяРНП (Charroux et al., 2000, Vaccon et al., 2002, Gubitzi et al., 2002, Pellizzoni et al., 2002, Grimmler et al., 2005, Carissimi et al., 2006).

Известно, что в каждом цикле сплайсинга ассоциация между собой компонентов сплайсосом происходит заново путем пошаговой сборки, из чего следует, что мутантный SMN не способен обеспечить эффективную сборку частиц мяРНП. Поэтому одна из гипотез, объясняющих механизм СМА, основана на том, что нарушение формирования мяРНП влияет на сплайсинг определенной группы генов, важных для функционирования цепи моторных нейронов (Eggert et al., 2006, Gabanella et al., 2007, Pellizzoni, 2007). Предположительно, пре-мРНК таких генов подвергается сплайсингу при участии дополнительных сплайсосом, которые содержат U11, U12, U4_{atac}/U6_{atac} и U5 мяРНП (Gabanella et al., 2007, Boulisfane et al., 2011). В то время как пре-мРНК большинства генов подвергается сплайсингу при

участии главных сплайсосом, в состав которых входят U1, U2, U4/U6 и U5 мРНК.

В 2006 году была обнаружена аксональная изоформа белка (α -SMN), продукта гена *SMN1* (Giavazzi et al., 2006). Аксональный транскрипт SMN отличается от полноразмерного транскрипта включением последовательности интрона 3, однако белок, транслируемый с данного транскрипта, короче белка SMN из-за стоп-кодона, находящегося на границе экзона 3 и интрона 3. Таким образом, белки SMN и α -SMN имеют идентичные N-концевые участки и отличаются C-концевой частью. α -SMN-белок, как обнаружено, селективно экспрессируется в течение критической фазы развития мотонейронов и локализуется преимущественно в аксонах, стимулируя аксоногенез. Во взрослом состоянии экспрессия данного белка снижается (Giavazzi et al., 2006). Однако существование специфической нейрональной изоформы α -SMN не объясняет того важного факта, что в большинстве случаев СМА в мРНК гена *SMN2* отсутствует экзон 7, поскольку кодирующими в α -SMN являются только первые четыре экзона (Carrel et al., 2006).

Другая гипотеза этиопатогенеза СМА предполагает, что причиной избирательной гибели моторных нейронов является нарушение специфической функции, которую выполняет SMN в аксонах данного типа нервных клеток (Fan, Simard, 2002, McWhorter et al., 2003, Rossoll et al., 2003, Carrel et al., 2006, Eggert et al., 2006, Gabanella et al., 2007, Pellizzoni, 2007). В частности, SMN может принимать участие в транспортировке рибонуклеопротеидных комплексов содержащих β -актин и/или специфические мРНК, что косвенно подтверждается локализацией данного белка в рибонуклеопротеидных гранулах нейритов и конусов роста двигательных нейронов. В ряде исследований показано, что снижение уровня SMN оказывает негативное влияние на нервно-мышечные синапсы и скелетную мускулатуру (Martinez et al., 2012, Kariya et al., 2014). Высокий уровень белка SMN необходим на стадии формирования и поддержания

функции нервно-мышечных синапсов и самих скелетных мышц. Хотя данный аспект может иметь второстепенное значение по сравнению с дегенерацией аксонов двигательных нейронов по причине нарушения формирования мРНК. Также имеются данные о том, что дефицит SMN сопровождается снижением количества шванновских клеток и, соответственно, нарушением миелинизации нервных волокон (Hunter et al., 2014).

И наконец, недостаток белка SMN, по всей вероятности, может оказывать влияние на функционирование нейронов других типов, в том числе таких, как сенсорные нейроны и интернейроны, что также вносит свой вклад в развитие заболевания (Imlach et al., 2012).

1.1.3. Основные модели СМА в системе *in vivo*

Функции белка SMN в патогенезе СМА изучаются на нескольких модельных организмах (Таблица 1). Однако работа с животными осложняется тем, что их геномы содержат только один ген *Smn*, эквивалентный гену *SMN1* человека. Поэтому при нокауте *Smn* все животные погибают, а время гибели определяется уровнем мРНК этого гена, которая досталась новому организму от матери. Так, у мышей с нокаутом *Smn* гибель происходит на ранних этапах развития (Schrank et al., 1997), а у организмов, откладывающих яйца, например у *D. melanogaster*, смерть наступает позднее, когда уровень белка SMN, доставшегося от матери, снизится до критической точки (Chan et al., 2003). Тканеспецифичный дефицит SMN приводил к нарушению развития исследуемой ткани и гибели большей части ее клеточного компонента (Frugier et al., 2000, Cifuentes-Diaz et al., 2001, Vitte et al., 2004).

Мышам с нокаутом *Smn* обычно встраивают в геном дополнительные копии *SMN2* человека. Две копии этого гена обеспечивают большую выживаемость эмбрионов, в то время как восемь копий приводят к

появлению мышей с нормальным фенотипом (Hsieh-Li et al., 2000, Monani et al., 2000). Показано, что двух копий *SMN2* достаточно для нормального функционирования большинства тканей, однако моторным нейронам необходим более высокий уровень SMN, по крайней мере, у мыши (Gavrilina et al., 2008). При внедрении трансгена, несущего последовательность гена *Smn* без 7 экзона, в мышечной модели СМА наблюдалось увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных до 14-дневного возраста (Le et al., 2005), а также была показана специфическая двигательная дисфункция (Butchbach et al., 2007). А при внесении точечной мутации, приводящей к замене Ala2Gly в белке SMN, показано смягчение фенотипа заболевания (Gavrilina et al., 2008).

При моделировании СМА у *Danio rerio* использовали нокдаун *Smn* с помощью морфолиновых антисенс-олигонуклеотидов (McWhorter et al., 2003). В данной модели обнаружены ранние дефекты роста аксонов, предшествующие апоптозу двигательных нейронов. Также получены модельные *Danio rerio*, имеющие различные точечные мутации *Smn*: две мутации, приводящие к остановке транскрипции - Tyr267 и Leu265, и одна миссенс-мутация Gly264Asp в 7 экзоне *Smn*, которая, как было показано, соответствуют мутации Gly279Val в гене *SMN1* человека (Boon et al., 2009). Патологический фенотип проявлялся в сокращении уровня белка SMN и/или его нестабильности, при этом гомозиготные по мутациям эмбрионы имели уменьшенную длину оси тела и меньшие размеры. Также было показано снижение уровня белка синаптических везикул SV2, который восстанавливался при экспрессии *SMN1* человека. Таким образом, была продемонстрирована важная роль белка *Smn* в обеспечении пресинаптической целостности.

Для проведения трудоемких масштабных экспериментов используют, как правило, беспозвоночных и позвоночных, не относящихся к классу млекопитающих. Например, на *C. elegans* и *D. melanogaster* удобнее проводить полномасштабный молекулярно-генетический скрининг

химических агентов – потенциальных кандидатов на роль лекарственных средств.

Таблица 1. Модели СМА *in vivo*.

Модельный объект	Мутация в гене <i>Smn</i>	Фенотип	Ссылка
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Нокаут, нокдаун, точковые мутации	Гибель эмбрионов, дефекты развития, моторные дефекты, уменьшение продолжительности жизни.	(Miguel-Aliaga et al., 1999, Briese et al., 2009, Sleigh et al., 2011)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Точковые мутации, эквивалентные нуль-аллелям, мутации, приводящие к нарушению распределения <i>Smn</i> у взрослых мух, нокдаун.	Гибель эмбрионов, потеря способности летать и прыгать.	(Chan et al., 2003, Rajendra et al., 2007, Chang et al., 2008)
<i>Danio rerio</i>	Нокдаун	Гибель, нарушение формирования аксонов.	(McWhorter et al., 2003)
<i>Mus musculus</i>	Нокаут, направленное изменение экспрессии определенных генов в тканях в конкретные промежутки времени, внедрение трансгенов гена <i>SMN1</i> человека с известными миссенс мутациями, внедрение дополнительных копий <i>SMN2</i> .	Гибель эмбрионов, апоптоз клеточного компонента ткани, в которой не экспрессируется <i>Smn</i> , фенотип варьирует в зависимости от типа мутации и наличия дополнительных трансгенов, две копии увеличивают продолжительность жизни эмбрионов до пяти дней.	(Schrank et al., 1997, Frugier et al., 2000, Hsieh-Li et al., 2000, Monani et al., 2000, Cifuentes-Diaz et al., 2001, Vitte et al., 2004, Workman et al., 2009)

Так, на нематоде с мутацией *smn-1(cb131)* были отобраны три вещества, наиболее эффективно изменяющие мутантный фенотип: 4-AP (блокатор калиевых каналов), габоксадолгидрохлорид (рецепторный агонист GABA_A) и моносахарид Neu5Ac (Sleigh et al., 2011). Таким образом, эта модель может служить основой для скрининга соединений, модифицирующих функции белка Smn.

Действие самых эффективных веществ далее изучают на более сложных объектах, в частности на *D. rerio* и мыши. Появились данные о том, что GTP-аза RhoA и активирующая ее Rho-киназа (ROCK), участвующие в обеспечении формирования цитоскелета, имеют важное значение при заболеваниях моторных нейронов. Добавление ингибиторов ROCK мышам со СМА увеличивало продолжительность их жизни, улучшало состояние нервно-мышечных синапсов и скелетных мышечных волокон (Coque et al., 2014). Эти данные находят подтверждение и у человека. Так, в ходе проведения полногеномного анализа метилирования были обнаружены значительные отличия в уровне метилирования двух генов *SHML* и *ARHGAP22* у больных СМА и здоровых индивидов. Продукты этих генов регулируют функцию GTP-аз Rho и Rab – регуляторов динамики актина и, следовательно, могут влиять на инициацию, рост, направление и ветвление аксонов (Zheleznyakova et al., 2013).

1.1.4. Молекулярно-генетическая диагностика СМА

Молекулярно-генетические тесты первого уровня включают проведение ПЦР-ПДРФ анализа или аллель-специфической ПЦР для выявления гомозиготной делеции 7/8 экзонов гена *SMN1* (Marini et al., 2012). Классический метод ПЦР-ПДРФ основан на амплификации участков 7 и 8 экзонов генов *SMN1* и *SMN2*, содержащих однонуклеотидные замены (van der Steege et al., 1995). ПЦР-продукт 8 экзона *SMN2* благодаря такой замене имеет сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции *DdeI*, а ПЦР-продукт 7

экзона *SMN2* – *DraI*. Таким образом, при наличии гомозиготной делеции 7 и 8 экзонов гена *SMN1* на электрофореze в обоих вариантах будут визуализироваться только продукты рестрикции гена *SMN2* (Рисунок 2).

С помощью аллель-специфической ПЦР также можно детектировать гомозиготную делецию *SMN1* (Ravard-Goulvestre et al., 1999, Moutou et al., 2001, Simsek et al., 2003, Xu et al., 2003). Однако в ряде случаев возможен неспецифический отжиг праймеров на ген *SMN2* (Marini et al., 2012). Кроме того, данные методы не позволяют обнаружить более редкие варианты мутаций – когда пациент имеет точечную мутацию *SMN1* в компаунде с делецией, или две точечных мутации *SMN1*. Также не следует забывать, что одним из важнейших диагностических критериев является количество копий гена-модификатора *SMN2*, которое нельзя точно определить с помощью тестов первого уровня.

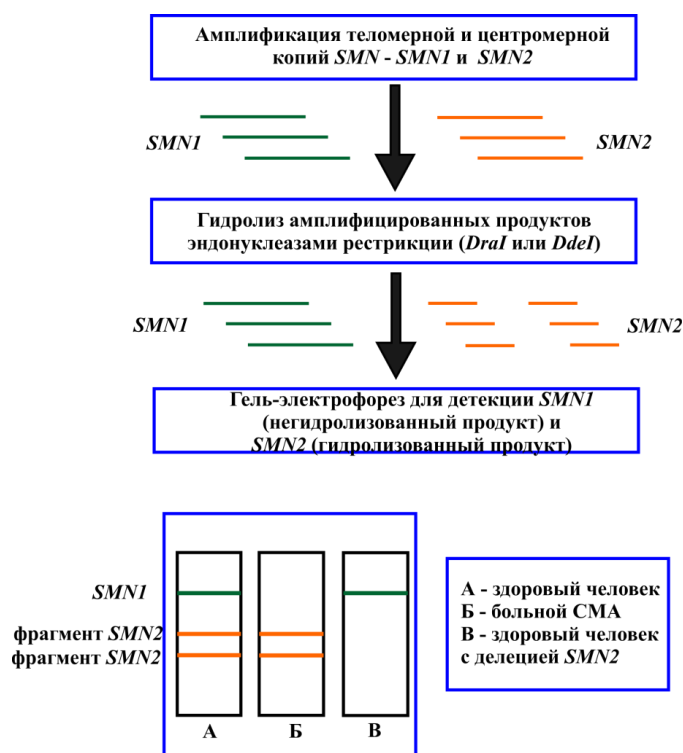


Рисунок 2. Метод ПЦР-ПДРФ для выявления гомозиготной делеции 7 и 8 экзонов гена *SMN1*.

Поэтому проводятся тесты второго уровня. Наибольшее распространение получили методы диагностики, основанные на мультиплексной

амплификации лигированных зондов (MLPA - multiplex ligation dependent probe amplification) и количественной ПЦР (Arkblad et al., 2006, Rudnik-Schoneborn et al., 2009). MLPA - метод, основанный на ПЦР и позволяющий проводить количественную оценку множественных локусов генома в одной реакции. Он основан на лигировании набора из двух олигонуклеотидных зондов, которые последовательно отжигаются на мишень. Только лигированные зонды могут служить матрицей для последующей ПЦР. Результаты реакции анализируют с помощью капиллярного электрофореза или секвенатора с функцией фрагментного анализа. Компьютерная программа обрабатывает полученные данные, нормализуя высоту пиков или их площадь для каждого ПЦР-продукта на соответствующие значения для локусов-стандартов, которые всегда присутствуют в двух копиях на геном (используется около 20 локусов-стандартов). Следовательно, в случае здорового индивидуума нормализованное значение будет равно 1 – две копии *SMN1* на геном, в случае гетерозиготы – 0,5, в случае гомозиготной делеции 7 экзона *SMN1* – 0 (Рисунок 3) (Passon et al., 2010).

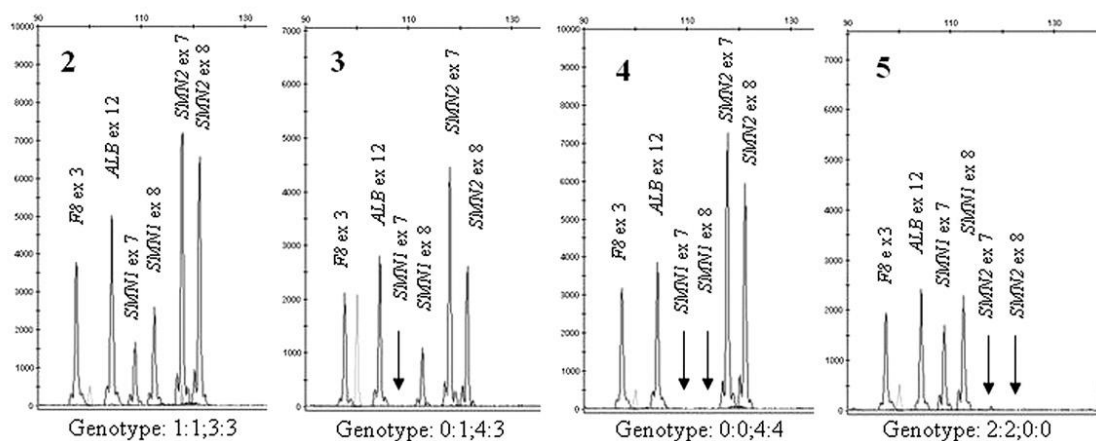


Рисунок 3. Электрофореграмма результатов MLPA-исследования (Passon et al., 2010).

2 – здоровый человек, 2 копии *SMN1*, 2 копии *SMN2*; 3 – носитель СМА, гетерозиготная делеция 7 экзона гена *SMN1*; 4 – больной СМА I типа, гомозиготная делеция 7 и 8 экзонов гена *SMN1*; 5 – здоровый человек, гомозиготная делеция 7 и 8 экзонов гена *SMN2*.

Количественная ПЦР при диагностике СМА используется в нескольких вариантах. При детекции флуоресцентного сигнала по конечной точке проводят одновременную амплификацию в одной реакции *SMN1*, *SMN2*, референсного гена и внутренних контролей (McAndrew et al., 1997). Главным преимуществом этого метода является то, что внутренний контроль амплифицируется с теми же праймерами, что и последовательность-мишень. Таким образом, при одинаковой эффективности амплификации ДНК пациента и ДНК стандарта можно точно определить число копий *SMN1/SMN2*. При детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени мультиплексную ПЦР проводят с гидролизными или гибридационными зондами, а для нормализации полученных значений используют два основных метода – построение калибровочной кривой или сравнительный пороговый метод (Anhuf et al., 2003, de Souza Godinho et al., 2012). Калибровочная кривая строится с использованием калибровочных образцов, в которых заведомо известно количество копий ДНК. Эта кривая затем используется в качестве эталона для экстраполяции количественной информации и определения числа копий *SMN1/SMN2*. Цикл амплификации, в котором кинетическая кривая реакции пересекает установленный порог называется пороговым циклом (*Ct*) и зависит от исходного количества ДНК-мишени. Используя сравнительный пороговый метод, сравнивают значения *Ct* анализируемого образца со значениями *Ct* калибратора. Значения *Ct* калибратора и исследуемого образца нормируют на соответствующие значения внутреннего контроля.

К ограничениям как количественной ПЦР, так и MLPA, относится то, что данные методы не пригодны для диагностики СМА, если обе копии гена *SMN1* находятся в положении *in-cis* на одной хромосоме, что наблюдается в среднем у 5-8% людей (McAndrew et al., 1997).

Если по результатам тестов второго уровня обнаружилась одна копия гена *SMN1*, то проводится тест третьего уровня – секвенирование аллеля, не имеющего делеции 7 экзона, для обнаружения второй мутации в

кодирующем районе гена. Однако у некоторых пациентов с типичной клинической картиной СМА не обнаруживается второй мутации в кодирующей области *SMN1/SMN2*. Причем наиболее часто подобные результаты наблюдаются у больных СМА III типа, у которых, вероятно, вторая мутация может находиться в интроне. Также секвенирование показано для пациентов, имеющих две копии гена *SMN1* и являющихся потомками от близкородственных браков или происходящих из генетических изолятов (Cusco et al., 2003). В этом случае велика вероятность обнаружения двух точечных мутаций *SMN1*.

Ввиду того, что проксимальная СМА является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний, важно выявлять носителей мутации, особенно если в родословной уже были случаи рождения детей с данным заболеванием. Большинство носителей имеют гетерозиготную делецию в гене *SMN1*, которую можно обнаружить как с помощью классического метода ПЦР-ПДРФ (Marini et al., 2012) с праймерами, специфичными к генам *SMN1* и *SMN2*, так и с помощью более точных методов - ПЦР в реальном времени (de Souza Godinho et al., 2012) или MLPA (Passon et al., 2010).

1.2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека как основа для создания клеточных моделей спинальной мышечной атрофии

1.2.1. Открытие феномена индуцированной плюрипотентности

Открытие индуцированной плюрипотентности стало возможным благодаря синтезу научных направлений и технологий, которые были разработаны в течение последних шести десятилетий:

- 1) технология пересадки ядер соматических клеток (SCNT – somatic cell nuclear transfer) и клонирование животных, которые

продемонстрировали, что дифференцированные клетки несут ту же генетическую информацию, что и клетки раннего эмбриона;

- 2) открытие транскрипционных факторов, являющихся ключевыми в определении направления развития клеток и тканей организма;
- 3) развитие методов, обеспечивающих получение, культивирование и исследование плюрипотентных клеточных линий, в первую очередь эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).

В процессе развития млекопитающих, клетки постепенно теряют свой изначальный потенциал и становятся дифференцированными для выполнения специализированных функций. Только зиготы и бластомеры ранней морулы сохраняют способность давать начало всем эмбриональным и внезародышевым тканям, и поэтому такие клетки называются тотипотентными (Kelly, 1977). Клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты имеют уже ограниченный потенциал развития – дают начало всем тканям и органам эмбриона, но не вносят вклад в формирование внезародышевых тканей и органов, и, следовательно, называется плюрипотентными. Резидентные стволовые клетки взрослого организма способны дифференцироваться в пределах определенной ткани или органа и называются мультипотентными или унипотентными, в зависимости от широты спектра образуемых ими дифференцированных производных. Терминально дифференцированные клетки полностью теряют свой потенциал развития.

В 1950-х годах Бриггс и Кинг разработали технологию SCNT, позже названную клонированием, чтобы исследовать потенциал развития ядер, выделенных из эмбрионов на поздних стадиях развития и головастиков и трансплантированных в энуклеированные ооциты (King, Briggs, 1955). А в 1962 году Дж. Гэрдон из неоплодотворенных яиц лягушки, в которые были трансплантированы ядра кишечного эпителия взрослого организма, получил головастиков (Gurdon, 1962). Три десятилетия спустя Уилмут с соавторами сообщили о рождении Долли - первого млекопитающего, полученного с

помощью технологии клонирования из яйцеклетки, в которую было трансплантировано ядро эпителия молочных желез овцы другой породы (Wilmut et al., 1997). Тем самым, было показано, что дифференцированные клетки не только амфибий, но и млекопитающих действительно сохраняют генетическую информацию, необходимую для развития целого организма. Однако в последующих работах было обнаружено, что большинство клонированных животных имеют патологические нарушения экспрессии генов, отражающиеся в фенотипе (Hochedlinger, Jaenisch, 2002, Eggan et al., 2004, Li et al., 2004). Следовательно, в процессе дифференцировки клеток устанавливаются необратимые эпигенетические модификации, которые препятствуют формированию здорового организма с помощью технологии SCNT (Tamashiro et al., 2002, Gurdon et al., 2003).

Вторым важнейшим достижением, способствовавшим открытию индуцированной плюрипотентности, стало открытие генов «master regulator», кодирующих транскрипционные факторы, обеспечивающие запуск экспрессии тканеспецифичных генов и определяющих направление развития клетки. В 1987 году был открыт транскрипционный фактор *Antennapedia*, эктопическая экспрессия которого индуцировала образование ног вместо усиков у дрозофилы (Schneuwly et al., 1987). В том же году, фибробласты мыши, трансдуцированные ретровирусами, обеспечивающими экспрессию транскрипционного фактора *MyoD*, были перепрограммированы в мышечные клетки, имеющие миофибриллы (Davis et al., 1987). Таким образом сформировалось целое научное направление, занимающееся трансдифференцировкой. Граф с коллегами обнаружили, что первичные В- и Т-клетки могут быть преобразованы в функциональные макрофаги посредством сверхэкспрессии миелоидного фактора транскрипции *C/EBP α* (Xie et al., 2004, Laiosa et al., 2006). Найдены транскрипционные факторы, обеспечивающие трансдифференцировку ацинарных клеток поджелудочной железы в инсулин-продуцирующие В-клетки (Zhou et al., 2008). Сверхэкспрессия *ASCL1*, *BRN2* и *MYT1L* обеспечивает

перепрограммирование фибробластов в нейроны (Vierbuchen et al., 2010), а сверхэкспрессия *GATA4*, *MEF2C* и *TBX5* - в кардиомиоциты (Ieda et al., 2010). Таким образом, было показано, что трансдифференцировке подвергаются клеточные типы, сформированные даже из разных зародышевых листков, в частности, фибробласты имеют мезодермальное происхождение, в то время как нейроны являются производными эктодермы.

Изучение мультипотентных стволовых клеток началось еще в 1950-1960-х гг. Так, в 1963 году Мак-Каллок и Тилл обнаружили самообновляющиеся клетки в костном мозге мышей – мультипотентные стволовые клетки кроветворно-лимфатической ткани (Siminovitch, 1963). Клетки, демонстрирующие некоторые черты плюрипотентных клеток, - клетки эмбриональной карциномы мыши, активно исследовались на протяжении тридцати лет (1950-1970) (Martin, Evans, 1975). И только в 1981 году Эванс, Кауфман и Мартин сумели получить и ввести в культуру эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), происходящие из ВКМ бластоцисты мыши (Martin, 1981). ЭСК характеризуются способностью к самообновлению (He et al., 2009). Ключевым свойством этих клеток является плюрипотентность – способность давать при дифференцировке производные трех основных зародышевых листков, которые составляют организм (Ulloa-Montoya et al., 2005). В частности, при введении в бластоцисту мыши, ЭСК дают вклад во все органы и ткани нового организма, в том числе формируют функциональные гаметы (Bradley et al., 1984). Только через 17 лет после данного открытия группой Томсона были получены первые ЭСК человека (Thomson et al., 1998). Было показано, что плюрипотентность и самообновление ЭСК поддерживается ключевыми транскрипционными факторами *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* (Loh et al., 2006).

Основываясь на этих данных, ученые под руководством Яманаки, провели работу по индукции плюрипотентности в соматических клетках мыши путем эктопической экспрессии разных комбинаций транскрипционных факторов, имеющих повышенную экспрессию в ЭСК. Было осуществлено

репрограммирование фибробластов мыши, трансфицированных лентивирусными векторами, экспрессирующими транскрипционные факторы *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, в плюрипотентные клетки, демонстрирующие схожие свойства с ЭСК, и названные индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) (Takahashi, Yamanaka, 2006). Однако первые линии ИПСК имели значительные отличия в профиле экспрессии генов, по сравнению с ЭСК, и при их инъекции в бластоцисты развивались нежизнеспособные химеры. В дальнейшем эксперимент был модифицирован и следующее поколение ИПСК демонстрировало все свойства, характерные для ЭСК: морфологию ЭСК, активность теломеразы, экспрессию генов, характерных для ЭСК, жизнеспособные химеры, дифференцировку в производные всех трех зародышевых листков, способность давать функциональные гаметы.

Детальный анализ транскриптома и протеома показывает наличие в репрограммировании двух фаз – ранней и поздней, во время которых происходит большинство ключевых событий, которые связаны с изменениями в экспрессии мРНК и микроРНК, а также представленности и активности белков (Hansson et al., 2012, Polo et al., 2012). В раннюю фазу происходят изменения экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток, репликацию ДНК, организацию цитоскелета и метаболизм, кроме того, репрессируются гены, связанные с дифференцировкой, в частности гены, контролирующие клеточные контакты и адгезию. Во время поздней фазы активируются гены, контролирующие раннее развитие, а также гены, необходимые для перехода к стабильному плюрипотентному состоянию, такие как *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Esrrb*, *Dnmt3L*, *Tcl1*. Некоторые гены, например, *Alpl*, *Fbx15*, *Nr0b1*, *Tcfcp2l1*, *Sall4*, активируются в процессе репрограммирования постепенно.

1.2.2. Способы репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию

Первый способ репрограммирования был основан на интеграции в геном трансгенов – ретровирусных векторов, обеспечивающих эктопическую экспрессию факторов репрограммирования, и соответственно индукцию плюрипотентного состояния (Takahashi, Yamanaka, 2006). Ретровирусы обладают достаточно высокой эффективностью трансдукции, хотя и не одинаковой для различных типов клеток. При этом необходимо, чтобы клетка-хозяин имела достаточно высокий темп деления, что характерно для довольно ограниченного спектра клеток, которые можно поддерживать в культуре. Поэтому в дальнейшем стали использовать другие векторные системы. Так, Ю с соавторами использовали лентивирусные вектора, обеспечивающие экспрессию *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Lin28*, для репрограммирования фибробластов мыши и человека (Yu et al., 2007). Лентивирусы эффективно трансдуцируют даже неделящиеся клетки. Однако и ретро- и лентивирусные вектора, интегрируясь в геном клетки, могут привносить промоторные элементы, сигналы полиаденилирования, встраиваться в кодирующие части генов, вызывая нарушение транскрипции. Некоторые исследования показывают, что в ретровирусных конструкциях может возобновляться транскрипция трансгенов в клетках производных ИПСК, что делает невозможным использование таких клеток для клинических исследований (Okita et al., 2007). Поэтому в дальнейшем наибольшее распространение получила индуцибельная лентивирусная система, в которой вирусная кассета находится под управлением промотора, активируемого добавлением доксициклина (Maherali et al., 2008).

Другой подход к трансген-опосредованному репрограммированию заключается в использовании невирусных векторов. Например, Меркл с соавторами использовали доксициклин-индуцибельные плазмиды,

содержащие *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* мыши для репрограммирования фибробластов крысы (Merkl et al., 2013).

Способы получения ИПСК без интеграции трансгенных последовательностей в геном можно разделить на три категории:

- использование векторов, которые не интегрируются в геном клетки-хозяина;
- использование интегрирующихся в геном векторов, которые впоследствии удаляются;
- репрограммирование без использования ДНК.

Первые ИПСК, «свободные» от трансгенов, были получены с помощью аденовирусных векторов из гепатоцитов мыши (Stadtfield et al., 2008), а также с помощью не интегрирующихся в геном плазмид (Okita et al., 2008). Эти эксперименты показали, что временной экспрессии четырех факторов репрограммирования достаточно для индукции плюрипотентности в соматических клетках мыши. Фибробласты человека также были репрограммированы в ИПСК с помощью аденовирусных векторов (Zhou, Freed, 2009), векторов на основе вируса Сендай (Fusaki et al., 2009), с помощью полицистронных миникольцевых векторов (Jia et al., 2010) и эписом (Yu et al., 2009, Okita et al., 2011). Репрограммирование с помощью эписом требует одновременной сверхэкспрессии не только *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*, но и *Lin28*, а также *SV40LT* либо *EBNA-1*. Недостатком перечисленных способов репрограммирования является низкая эффективность, которая на несколько порядков ниже (0,001%), чем эффективность, достигаемая с помощью интегрирующихся в геном векторных систем (0,1% -1%).

Поэтому некоторые исследователи пошли по второму пути - использование интегрируемых в геном векторов, фланкированных сайтами *loxP*, которые впоследствии можно удалить из генома клетки-хозяина с помощью экспрессии Cre-рекомбиназы (Kaji et al., 2009, Soldner et al., 2009). Данный подход обеспечивает эффективное репрограммирование различных

типов клеток, особенно при использовании полицистронных вирусных кассет (Chang et al., 2009, Sommer et al., 2010). Однако после вырезания вирусной кассеты с помощью Cre-loxP системы остаются короткие последовательности ДНК, поэтому данный способ не является в полной мере «transgene-free». Альтернативным способом является использование piggyBac транспозонов - мобильных генетических элементов, которые интегрируются в геном хозяина, а затем могут быть вырезаны посредством экспрессии транспозазы (Woltjen et al., 2009, Yusa et al., 2009)(Woltjen и др 2009; Юса и другие. 2009). Низкая частота ошибок, а также вырезание «без следов» являются несомненными преимуществами данного подхода.

Относительно эффективное репрограммирование соматических клеток было показано без использования вирусных или плазмидных векторов вообще. В частности, из фибробластов мыши и человека были получены ИПСК путем доставки факторов репрограммирования в форме очищенных рекомбинантных белков (Zhou et al., 2009), клеточных экстрактов, выделенных из ЭСК (Cho et al., 2010), генетически трансформированных клеток линии HEK293 (Kim et al., 2009). Использование очищенных белков представляет собой привлекательный подход для получения ИПСК без интеграции трансгенов, но эффективность такого метода крайне низка, хотя добавление ингибитора гистоновых деацетилаз - вальпроевой кислоты в культуральную среду несколько увеличивает выход ИПСК. Альтернативным и более эффективным способом является доставка молекул РНК, кодирующих факторы репрограммирования (Warren et al., 2010), либо определенных микроРНК.

Для повышения общей эффективности репрограммирования при использовании перечисленных подходов широко применяются химические соединения – малые молекулы, некоторые из которых способны заменить отдельные факторы репрограммирования (Li,Ding, 2010). Соединение E-616452 (RepSox) – ингибитор TGF- β способно заменить Sox2 при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши (Ichida et al.,

2009). Кенпауллон - ингибитор GSK3 дополняет эффект *Klf4* (Lyssiotis et al., 2009). Было показано, что примерно 200-кратное увеличение эффективности репрограммирования достигается при добавлении SB431542 (ингибитор ALK5), PD0325901 (ингибитор MEK) и thiazovivin совместно с классическими факторами репрограммирования (Lin et al., 2009). Эффективность репрограммирования также повышают A-83-01, PS48, бутират натрия (Zhu et al., 2010), витамин C (Esteban et al., 2010), VIX-01294, BayK8644 (Shi et al., 2008), вальпроевая кислота (Huangfu et al., 2008). Кроме того, показано, что семь малых молекул способны репрограммировать соматические клетки мыши в отсутствие экспрессии экзогенных транскрипционных факторов (Hou et al., 2013). Тем не менее, следует отметить, что в большинстве случаев химическое репрограммирование сопровождается низким выходом клонов ИПСК, следовательно, ни одно химическое соединение не способно полностью заменить функцию транскрипционного фактора.

1.2.3. Методы, используемые для оценки плюрипотентного статуса стволовых клеток человека

Для оценки плюрипотентного статуса клеток человека, как правило, используют следующие характеристики:

- морфология колоний и активность щелочной фосфатазы;
- экспрессия маркеров, характерных для плюрипотентных клеток;
- дифференцировка в системе *in vitro*;
- дифференцировка в системе *in vivo*;
- дополнительные характеристики (активность теломеразы, направленная дифференцировка, транскрипционный и эпигенетический профили и др.).

На сегодняшний день практически в любой работе, связанной с получением новых линий ЭСК и ИПСК человека, приводится

иммуноцитохимическая окраска, демонстрирующая экспрессию транскрипционных факторов OCT4, SOX2, NANOG и поверхностных антигенов TRA1-61, TRA1-81 и SSEA4. Они являются общепринятыми маркерами плюрипотентных клеток человека. Кроме того, экспрессия вышеперечисленных и ряда дополнительных генов (Таблица 2), может быть показана с помощью ОТ-ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени. Международная организация ISCI (The International Stem Cell Initiative, Международная инициатива стволовых клеток), объединяющая наиболее крупные учреждения, работающие с ЭСК и ИПСК, предложила набор из 96 маркеров для оценки плюрипотентного статуса стволовых клеток человека (Adewumi et al., 2007).

Метод спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах был разработан еще в 1970-х гг. для клеток тератокарциномы (Martin, Evans, 1975). Эмбриоидные тельца формируются за счет агрегации клеток, переведенных в суспензионную культуру, и имитируют предимплантационную стадию развития в условиях *in vitro*. Анализ дифференцированных производных, полученных с помощью данного теста, проводят с помощью иммуноцитохимического окрашивания, либо ОТ-ПЦР. Несмотря на многочисленные попытки стандартизовать данный метод (Burridge et al., 2007, Ungrin et al., 2008), общепринятый протокол дифференцировки и стандартный набор генов, маркирующих производные трех зародышевых листков, до сих пор не согласован. Даже с учетом набора маркеров производных трех зародышевых листков (Таблица 3), в ряде случаев возникают трудности с их идентификацией, поскольку на поздних стадиях дифференцировки в эмбриоидных тельцах остаются недифференцированные клетки, экспрессирующие маркеры плюрипотентных клеток.

Основы тератомного теста, используемого для доказательства плюрипотентности и проверки широты спектра дифференцировки стволовых клеток в системе *in vivo*, были разработаны еще в 1950-1960-х гг.

(Stevens, Little, 1954, Stevens, 1964). Данный метод по-прежнему рассматривается некоторыми исследователями как безусловно необходимый тест для оценки плюрипотентного статуса ЭСК и ИПСК человека (Dolgin, 2010). Однако на практике только около половины всех полученных линий ЭСК или ИПСК были проанализированы с использованием данного теста (Muller et al., 2010). Во многом это обусловлено трудоемкостью метода и необходимостью работы с иммунодефицитными животными. Чаще всего используют иммунодефицитных мышей линии SCID. От 1,5 до 5 млн клеток вводят подкожно в область загривка, внутримышечно в область голени, под капсулу почки, семенника, а также в переднюю камеру глаза. Рост опухоли в месте введения происходит в среднем в течение двух-трех месяцев, после чего животных выводят из эксперимента, а материал опухоли анализируют с использованием гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов. При этом анализ спектра дифференцировки в составе тератомы, как правило, остается весьма поверхностным и качественным (Muller et al., 2010).

Одной из важнейших характеристик любой клеточной культуры, в том числе и плюрипотентных клеток человека, является нормальный кариотип. Для ПСК человека рекомендовано проводить анализ кариотипа на регулярной основе через каждые 10 пассажей культивирования (Loring, 2007). В ряде работ показаны специфические хромосомные абберации, а также генные мутации, характерные для плюрипотентных клеток человека (Mayshar et al., 2010, Laurent et al., 2011). Для обнаружения геномных и хромосомных мутаций используют методы рутинного и дифференциального окрашивания препаратов метафазных хромосом. При этом наиболее распространенным способом, в силу своей простоты, дешевизны, высокого разрешения и воспроизводимости, является G-дифференциальная окраска хромосом. Метод основан на окраске хромосом красителем Гимза после обработки цитологических препаратов протеолитическим ферментом трипсином. При этом в составе хромосомных плеч выявляются районы,

окрашиваемые с различной интенсивностью, - G-позитивные и G-негативные бэнды. Каждая пара гомологичных хромосом обладает своим уникальным паттерном дифференциальной исчерченности, что позволяет проводить хромосомный анализ на относительно высоком уровне разрешения. Метод FISH (fluorescence *in situ* hybridization; флуоресцентная гибридизация *in situ*) позволяет локализовать в метафазной хромосоме последовательности, гомологичные флуоресцентно-меченой ДНК-пробе. При этом ДНК-проба может быть как хромосомоспецифичной, так и районспецифичной. Существуют различные варианты FISH, которые позволяют идентифицировать численные хромосомные аномалии, микроделеции, транслокации и другие перестройки (Bishop, 2010). Показано, что ИПСК человека при длительном культивировании, способны приобретать от 1000 до 2000 полиморфизмов, в том числе более 10 несинонимичных замен в кодирующих областях генов (Cheng et al., 2012). Поэтому актуальной задачей становится идентификация точечных мутаций в ПСК с использованием методов с высокой разрешающей способностью. Для детекции SNP (single nucleotide polymorphism; однонуклеотидный полиморфизм) используют методы высокопроизводительного секвенирования, а также ДНК-микрочипы.

Поскольку с каждым клеточным делением теломеры укорачиваются, неограниченный потенциал к самообновлению ПСК возможен только при условии постоянного поддержания длины теломер. Поэтому ПСК характеризуются, как правило, высокой активностью теломеразы (Huang et al., 2014). Повышенная экспрессия теломеразы в ЭСК мыши и человека, как было показано, увеличивает скорость пролиферации, способность к самообновлению, образованию новых колоний, снижает апоптоз. Регуляция активности теломеразы является критически важным моментом для поддержания плюрипотентности и потенциала к дифференцировке стволовых клеток. Однако в ряде работ показано существование альтернативного, не зависящего от активности теломеразы, механизма регуляции длины теломер в ЭСК и ИПСК (Niida et al., 2000, Wang et al.,

2012). Для выявления активности теломеразы широко используется метод TRAP (telomeric repeat amplification protocol, протокол амплификации теломерных повторов), который состоит из трех этапов: удлинение праймера за счет теломеразы, присутствующей в клеточном экстракте, амплификация синтезированной теломеразной ДНК, детекция результатов ПЦР (Kim et al., 1994). В настоящее время разработаны различные модификации TRAP анализа, использующие разные подходы для визуализации и количественного определения продуктов ПЦР: в режиме реального времени - RTQ-TRAP, TRAP-ELISA, TRAP *in situ* и др. (Скворцов, 2011). Идентифицировать отдельные компоненты белковых комплексов, участвующих в удлинении теломер, можно также помощью иммуноцитохимического метода.

Первая работа, описывающая полногеномный профиль экспрессии генов в плюрипотентных стволовых клетках, была опубликована в начале 2000-х гг. (Loring et al., 2001). С тех пор транскрипционное профилирование ПСК стало широко используемым методом анализа. При этом наиболее распространенными являются работы по сравнительному анализу транскриптомов ИПСК и ЭСК (Chin et al., 2009, Guenther et al., 2010, Schuster et al., 2015). Транскрипционные профили могут быть получены как с помощью технологии ДНК микрочипов (DNA microarray) (Lamot et al., 2015), так и с помощью более современной технологии полногеномного секвенирования РНК (RNA-Seq) (Hrdlickova et al., 2016).

Поскольку плюрипотентные клетки характеризуются глобальным деметилированием ДНК, а также другими преобразованиями эпигенома, то эпигенетическое профилирование ЭСК и ИПСК человека также является актуальной задачей. У высших эукариот модификация ДНК происходит преимущественно в CpG-динуклеотидах путем добавления метальных групп к цитозиновым остаткам в положении C₅ пиримидинового кольца, что приводит к образованию 5-метилцитозиновых остатков (5 mC) в составе ДНК.

Таблица 2. Основные маркеры плюрипотентных клеток.

Белок	Роль	Функции
OCT 4	Транскрипционный фактор	Контроль ранних стадий эмбриогенеза млекопитающих, поддержание самообновления и плюрипотентности; репрограммирование соматических клеток
NANOG	Транскрипционный фактор	Поддержание пролиферации, самообновления, плюрипотентности; репрограммирование соматических клеток
SOX2	Транскрипционный фактор	Регуляция пролиферации, дифференцировки, апоптоза; репрограммирование соматических клеток
KLF4	Транскрипционный фактор	Регуляция пролиферации, дифференцировки, апоптоза; репрограммирование соматических клеток
MYC	Транскрипционный фактор	Регуляция пролиферативной активности клеток, апоптоза, дифференцировки, структуры хроматина
REX1	Транскрипционный фактор	Раннее эмбриональное развитие; эпигенетический контроль активности генов
TDGF1	Фактор роста	Раннее эмбриональное развитие; регуляция пролиферативной активности клеток
UTF1	Транскрипционный фактор	Регуляция уровня мРНК в клетке, активности хроматина; торможение дифференцировки клеток
DNMT3B	ДНК метилтрансфераза	Метилирование CpG островков – регуляция активности генов
LEFTB	Цитокин семейства TGF β	Раннее эмбриональное развитие
NODAL	Цитокин семейства TGF β	Раннее эмбриональное развитие; участие в пролиферации, дифференцировке клеток
FGF4	Фактор роста	Стимуляция митоза, снижение апоптоз; участие в эмбриональном развитии, рост клеток, морфогенезе
PODXL	Сиаломуцин	Регуляция адгезионной способности клеток, морфологии

Таблица 3. Основные маркеры производных трех зародышевых листков. Желтым выделены маркеры производных эктодермы, зеленым – мезодермы, голубым – энтодермы.

Белок	Роль	Функции
MAP2	Белок, ассоциированный с микротрубочками	Сборка микротрубочек (компоненты цитоскелета нейронов), нейрогенез
PAX6	Транскрипционный фактор	Регуляция развития нервной ткани
GFAP	Белок промежуточных филаментов	Образование промежуточных филаментов (компоненты цитоскелета) зрелых астроцитов
SOX1	Транскрипционный фактор	Регуляция развития нервной ткани
OLIG2	Транскрипционный фактор	Регуляция развития в направлении вентральной нейроэктодермы
HB9	Транскрипционный фактор	Регуляция развития в направлении моторных нейронов
ISL1	Транскрипционный фактор	Регуляция развития в направлении моторных нейронов
CHAT	Фермент	Осуществление биосинтеза ацетилхолина – основного медиатора нервно-мышечной передачи
SYNI	Синапсин	Синаптогенез, аксоногенез, регуляция функционирования зрелых синапсов
TUJ1	β -тубулин III класса	Формирование микротрубочек (компоненты цитоскелета нейронов), нейрогенез.
NF200	Тяжелая субъединица нейрофиламента	Формирование нейрофиламентов – компонентов цитоскелета нейронов, обеспечение аксонального транспорта
CD31	Мембранный гликопротеин	Обеспечение клеточной адгезии, трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, ангиогенеза, активации интегринов
α SMA	Актин	Образование актиновых миофибрилл – одного из основных элементов сократительного аппарата гладкомышечных клеток
Коллаген I	Фибриллярный белок	Основа межклеточного вещества соединительной ткани
Фибронектин	Структурный гликопротеин	Основа межклеточного вещества, вырабатывается практически всеми клетками организма

BRACHYURY	Транскрипционный фактор	Регуляция развития производных мезодермы
SOX17	Транскрипционный фактор	Регуляция развития производных эндодермы
FOXA2	Транскрипционный фактор	Активация генов, участвующих в развитии и функционировании печени
AFP	Эмбриональный гликопротеин	Избирательное связывание полиненасыщенных жирных кислот в плаценте и перенос их из крови матери в кровь эмбриона; синтезируется клетками печени плода
CK18	Белок промежуточных филаментов	Основной компонент цитоскелета эпителия кишечной трубки

Традиционные подходы эпигенетического профилирования геномов включают в себя методы, основанные на секвенировании бисульфитно-обработанной ДНК, и методы, использующие ферментативное расщепление ДНК эндонуклеазами, чувствительными к метилированию цитозиновых остатков ДНК (Grigg, 1996). Более современные подходы включают анализ модификаций гистонов с использованием технологии ChIP (chromatin immunoprecipitation; иммунопреципитация хроматина) (Kimura, 2013), а также методы, основанные на технологии массового параллельного секвенирования (Zentner, Henikoff, 2014).

1.2.4. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны

Разработка методов быстрой, масштабируемой и эффективной направленной дифференцировки ИПСК в моторные нейроны необходима для осуществления фармакологических, токсикологических исследований и комплексного изучения клеточных моделей СМА. В настоящее время имеется большое число протоколов дифференцировки культивируемых плюрипотентных клеток человека в моторные нейроны (Wichterle et al., 2002, Hu et al., 2009, Karumbayaram et al., 2009, Wada et al., 2009, Zeng et al., 2010, Boulting et al., 2011, Hester et al., 2011, Corti et al., 2012, Takazawa et al., 2012,

Amoroso et al., 2013, Burkhardt et al., 2013, Reinhardt et al., 2013, Sareen et al., 2013). Эффективная направленная дифференцировка в среде с определенным химическим составом основана на классической модели нейрогенеза (Watanabe et al., 2005), в которой внешние и внутренние сигналы, направляющие развитие по альтернативному направлению, сведены к минимуму. При этом возможно два варианта культивирования клеток – в эмбрионидных тельцах и в монослое.

Процесс получения зрелых моторных нейронов в зависимости от протокола занимает в общей сложности от 28 дней до двух месяцев и включает два основных этапа. Первый этап – нейральная индукция – получение нейроэпителиальных и общих нейральных предшественников, экспрессирующих такие маркеры, как транскрипционные факторы SOX1 и PAX6. Второй этап – дифференцировка полученных нейральных предшественников в направлении моторных нейронов путем добавления в среду специфических факторов – ретиноевой кислоты (РК) и SHH (sonic hedgehog).

Одновременное ингибирование сигнальных каскадов TGF- β /Activin/Nodal и BMP за счет использования малых молекул-антагонистов или рекомбинантных ингибиторов вызывает быструю и очень эффективную (>80%) нейральную индукцию (Smith et al., 2008, Chambers et al., 2009, Zhou et al., 2010). Активация сигнального каскада WNT, а также добавление ростовых факторов из семейства FGF и EGF повышают эффективность нейральной индукции (Streit et al., 2000, Joannides et al., 2007, Chambers et al., 2012). РК обеспечивает процесс каудализации нейральных предшественников – детерминации развития в сторону нейронов спинного мозга, а белок SHH или его низкомолекулярные агонисты (например, Smo-агонист или Purmorphamine) способствуют вентрализации – детерминации развития в сторону нейронов передних рогов спинного мозга (Wichterle et al., 2002). В результате действия описанных соединений нейральные предшественники дифференцируются в предшественники моторных

нейронов (ПМН), маркером которых является транскрипционный фактор OLIG2. На 4-5 неделе культивирования ПМН достигают терминальной стадии развития - моторные нейроны, экспрессирующие такие маркеры, как транскрипционные факторы HB9 и ISL1 (Рисунок 4А). Заключительная стадия дифференцировки включает формирование зрелых моторных нейронов (ЗМН), экспрессирующих холинацетилтрансферазу СНАТ. Процесс созревания МН ускоряет ингибирование сигнального каскада Notch и добавление нейротрофических факторов. Функциональность ЗМН подтверждается с помощью трех основных методов – электрофизиологических исследований, теста на формирование нервно-мышечных синапсов в системе *in vivo* или *in vitro*, трансплантации в эмбриональный спинной мозг экспериментальных животных (Рисунок 4) (Wichterle et al., 2002, Peljto et al., 2010).

Первые протоколы, в которых нейральная дифференцировка индуцировалась в эмбрионидных тельцах с последующей обработкой RA/SNH, были довольно трудоемкими и занимали в общей сложности около 2 месяцев, а также давали относительно низкий выход моторных нейронов (10–40%). Для повышения относительного количества ЗМН в суммарной популяции дифференцируемых клеток был разработан метод направленного программирования, основанный на аденовирусной доставке трех специфических для МН факторов транскрипции NGN2, ISL1 и LHX3 (Hester et al., 2011). Преимуществами данного метода являются скорость дифференцировки (мотонейроны из нейральных предшественников формируются в течение 11 дней) и большая эффективность (популяция ЗМН составляет порядка 60%).

В настоящее время разработаны протоколы, позволяющие довольно быстро (в течение 28-30 дней) и с большой эффективностью (свыше 80%) получать моторные нейроны без использования аденовирусов при культивировании клеток в монослое на коммерчески доступных матриксах типа Matrigel или Geltrex (Qu et al., 2014, Du et al., 2015).

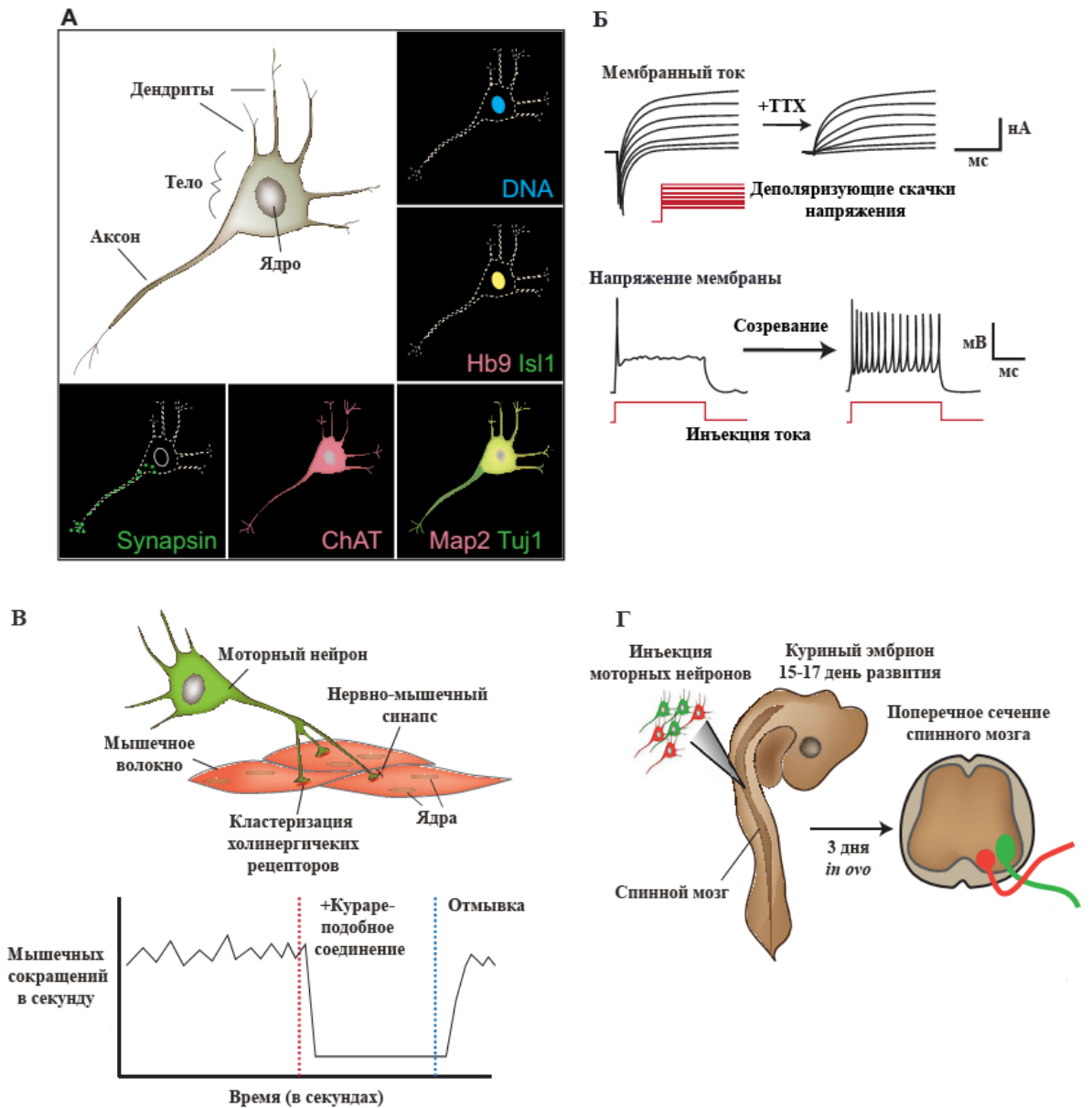


Рисунок 4. Характеристика моторных нейронов, полученных из ИПСК (Davis-Dusenbery et al., 2014).

(А) Морфология униполярных моторных нейронов (МН) и экспрессия основных маркеров данного типа клеток.

(Б) Оценка электрофизиологической активности МН. Быстрые инактивирующие выходящие токи в ответ на деполаризирующие скачки напряжения при добавлении ТТХ (tetrodotoxin – блокатор Na^+ ионных каналов) исчезают. При созревании МН обнаруживают серию повторяющихся потенциалов действия.

(В) Культивирование МН с мышечными клетками приводит к формированию функциональных нервно-мышечных синапсов. Сокращение мышечных волокон прекращается при добавлении курареподобных соединений – блокаторов нервно-мышечной проводимости.

(Г) Приживление трансплантированных МН в спинном мозге развивающихся куриных эмбрионов.

Дальнейшие усилия исследователей должны быть направлены не только на поиск новых более эффективных методов дифференцировки, но и на стандартизацию параметров пассирования и культивирования клеток согласно существующим методам, а также поиск способов направленной дифференцировки клеток в конкретные типы моторных нейронов.

1.2.5. Изучение клеточных моделей СМА

В настоящее время получены несколько линий ИПСК от больных СМА (Ebert et al., 2009, Corti et al., 2012, Sareen et al., 2012). Эти клетки дифференцируются в моторные нейроны *in vitro* с той же изначальной эффективностью, как и контрольные клетки, не имеющие в геноме мутаций *SMN1* (Ebert et al., 2009, Sareen et al., 2012). Однако во время продолжительного культивирования число и размер моторных нейронов, полученных от больных СМА, существенно сокращается по сравнению с культурами моторных нейронов здоровых доноров (Ebert et al., 2009). Подобное сокращение обусловлено повышенным уровнем апоптоза, опосредованного Fas-лигандом, и активацией каспаз-8 и -3. При этом добавление антител, специфичных к Fas-лиганду, и применение ингибитора каспазы-3 снижают уровень апоптоза мотонейронов (Sareen et al., 2012).

В ядре нервных клеток белок SMN располагается в составе особых структур – «gems» («gemini of coiled bodies» – «близнецы телец Кахаля»), названных так из-за сходства строения и функций, а также близкого расположения. Тельца Кахаля участвуют в созревании, сборке и транспорте мРНК, как и ассоциированные с ними gems (Liu, Dreyfuss, 1996). Показано, что количество «gems» в ядре коррелирует с формой СМА (Coover et al., 1997). У здоровых людей число «gems» соответствует числу телец Кахаля и они легко детектируются. У больных СМА I типа обнаружены только тельца Кахаля, тогда как «gems» отсутствовали, а при СМА III типа «gems» выявлены только в некоторых ядрах (Lefebvre et al., 1997, Young et al., 2000).

В ядрах нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК больных СМА, «gems» отсутствуют. Добавление вальпроевой кислоты и тобрамицина, применяемых в терапии СМА, существенно повышало число «gems» в клеточных ядрах и уровень белка SMN, однако и общий уровень белка SMN, и число «gems» все равно оставались значительно ниже, чем в клетках здоровых доноров (Ebert et al., 2009).

В работе Корти с соавторами ИПСК от больных СМА получали, используя невирусные, неинтегрируемые в геном эписомные вектора (Corti et al., 2012). Затем трансфецировали полученные клетки короткими одноцепочечными олигонуклеотидами, комплементарными 75 нуклеотидам кодирующей цепи этого гена. В центральной части этих олигонуклеотидов содержалась замена (такая же, как в экзоне 7, которая препятствует образованию полноценного белка). При рекомбинации с такой донорной молекулой в некоторых клетках ген *SMN2* становился «*SMN1*-подобным геном», т.е. с него транслировался нормальный полноразмерный белок SMN. Моторные нейроны, полученные из таких клеток с исправленным фенотипом, трансплантировали в спинной мозг мышей со СМА. В результате наблюдали некоторые положительные изменения патологического фенотипа, а также увеличение продолжительности жизни больных мышей. Однако положительная динамика, по всей видимости, была обусловлена тем, что трансплантированные клетки продуцируют нейротрофические факторы (Corti et al., 2012).

Известно, что при СМА патологические изменения происходят и в других типах клеток, включая астроциты, сенсорные нейроны, шванновские клетки, скелетные мышечные волокна (Jablonka et al., 2006, Ling et al., 2010, Voigt et al., 2010, Gogliotti et al., 2012, Murray et al., 2012). Линии ИПСК с генотипом СМА дифференцировали в сенсорные нейроны. При этом отмечали в них снижение кальциевого ответа на деполяризующие стимулы, однако выживаемость таких клеток не отличалась от клеток контрольной группы (Schwab, Ebert, 2014). Совместное культивирование сенсорных нейронов от

больных СМА и моторных нейронов от здоровых доноров не выявило значимого снижения числа мотонейронов, а также образования скоплений глутаматных транспортных везикул вблизи тел моторных нейронов или нейритов. Таким образом, показано, что в данной системе сенсорные нейроны, несущие мутацию *SMN1*, не вносят существенного вклада в гибель моторных нейронов с нормальным геном *SMN1*.

В исследовании Сюя с соавторами была показана роль дисфункции митохондрий в патогенезе СМА (Xu et al., 2016). Обнаружено, что транспорт и плотность митохондрий были значительно снижены в аксонах двигательных нейронов спинного мозга по сравнению с нейронами переднего мозга. Поскольку митохондрии являются основным поставщиком энергии, то нарушение аксонального транспорта митохондрий и уменьшение их общего количества в аксонах может служить одной из причин развития дефектов моторных нейронов при СМА. Причем наблюдаемые изменения в митохондриях происходили на ранних стадиях формирования двигательных нейронов, в течение первой недели после запуска завершающего этапа дифференцировки. Это согласуется с более ранними исследованиями, продемонстрировавшими, что показатели роста аксонов и сложности нейритов в двигательных нейронах с генотипом СМА изменяются в худшую сторону задолго до гибели данных клеток (Chang et al., 2011, Wang et al., 2013). Митохондриальный транспорт обнаружил тенденцию к снижению в обоих направлениях - антероградном и ретроградном, однако ретроградный транспорт был значительно снижен не только в аксонах моторных нейронов, полученных из ИПСК больного СМА, но и в аксонах нервных клеток, полученных из ЭСК с нокдауном *SMN*. Это наблюдение согласуется с данными, полученными на мышинной модели другой болезни моторных нейронов – бокового амиотрофического склероза (Magrane et al., 2014). Известно, что мутации в одной из субъединиц цитоплазматического динеина – одного из ключевых белков, осуществляющих ретроградный транспорт, также приводят к дегенерации моторных нейронов (Hafezparast et al., 2003,

Puls et al., 2003). Поэтому в дальнейшем необходимо выяснить, имеет ли место нарушение ретроградного аксонального транспорта в целом в данной модели СМА и насколько это нарушение значимо по сравнению с транспортом митохондрий. Было высказано предположение, что снижение общего количества митохондрий, а также уменьшение их относительного размера в моторных нейронах с генотипом СМА может быть обусловлено нарушением цикла развития данных органелл - деления и слияния. Кроме того, было показано, что описанная дисфункция митохондрий имеет тенденцию к исправлению при добавлении антиоксиданта NAC.

В работе Лю с соавторами были изучены электрофизиологические отклонения в пациент-специфичной модели СМА (Liu et al., 2015). Отмечено снижение количества холинацетилтрансферазы CHAT и везикулярного транспортера VACHT в моторных нейронах с генотипом СМА, которое влияет на передачу нервного импульса. В частности, показана гипервозбудимость мембран, связанная с повышенной активностью Na⁺ ионных каналов. Авторы отмечают, что непосредственно гибель моторных нейронов, по всей вероятности, не является основной причиной развития симптомов СМА, по крайней мере, на ранних стадиях. Ключевым моментом в патогенезе СМА, по-видимому, являются измененные свойства мембран моторных нейронов. Повышенная возбудимость мембран двигательных нейронов также обнаружена в мышинной модели СМА (Mentis et al., 2011) и при БАС (Kuo et al., 2005, Wainger et al., 2014). Гипервозбудимость и сниженная синаптическая передача, обнаруженные в данной модели СМА, могут усиливать друг друга по принципу обратной связи, что в конечном счете приводит к прекращению передачи нервного импульса к мышечному волокну.

Охичи с соавторами изучили влияние аналогов тиреотропин-рилизинг-гормона (ТРГ) на фенотип пациент-специфичных моторных нейронов (Ohuchi et al., 2016). ТРГ - пептидный гормон, который секретируется гипоталамусом и стимулирует секрецию пролактина и тиреотропного

гормона гипофизом, а также играет важную роль в общей регуляции метаболизма (Jackson, 1982). Ранее было показано, что аналоги ТРГ являются перспективными соединениями для лечения нейродегенеративных заболеваний. Так, введение аналога ТРГ способствовало высвобождению ацетилхолина в коре головного мозга и гиппокампе (Giovannini et al., 1991) и усилению мозгового кровообращения у экспериментальных крыс (Inanami et al., 1988). Кроме того, аналоги ТРГ защищают нейроны от токсического действия глутамата (Veronesi et al., 2007), а защитный эффект зависит от концентрации используемого вещества (Iwasaki et al., 1992). В экспериментах на животных было показано положительное влияние аналогов ТРГ на длину аксонов моторных нейронов, а также снижение апоптоза, вызванного активацией каспазы-3 (Koo et al., 2011). Добавление аналогов ТРГ приводило к повышению уровня белка SMN в моторных нейронах спинного мозга, полученных из ИПСК больных СМА, за счет ингибирования сигнального каскада GSK-3 β и активации транскрипции гена *SMN2* (Ohuchi et al., 2016). Также был показан стимулирующий эффект аналогов ТРГ на рост аксонов и дендритов в моторных нейронах с генотипом СМА.

Эффекты аналогов ТРГ на фенотип моторных нейронов больных СМА аналогичны эффектам, наблюдаемым при добавлении вальпроевой кислоты, которая, как было показано, стимулирует транскрипцию *SMN2* (Brichta et al., 2003). Однако при клинических испытаниях данных веществ положительная динамика в развитии заболевания отмечается не всегда. Поэтому по-прежнему актуальным остается поиск новых лекарственных соединений и тестирование уже найденных веществ на существующих клеточных моделях, в том числе и для прогнозирования эффекта перед испытаниями на пациентах.

В заключение необходимо отметить что, несмотря на значительный прогресс в развитии биологии и медицины до сих пор не найдено эффективных способов лечения для большинства наследственных заболеваний, в том числе и для такого тяжелого заболевания, как проксимальная аутосомно-рецессивная СМА. Изучение модельных организмов, демонстрирующих некоторые симптомы данного заболевания, существенно расширило наши представления о причинах и механизмах развития СМА, а также позволило отобрать ряд химических соединений, которые были направлены для проведения доклинических и клинических испытаний. Однако большинство потенциальных веществ-кандидатов в лекарственные препараты не прошли последние стадии клинических испытаний.

В последнее время появились новые модельные системы СМА, основанные на дифференцированных производных ЭСК и ИПСК. Изучение данных моделей открывает широкие перспективы для использования этих клеток в заместительной терапии и скрининге новых лекарственных средств. Наибольшие перспективы связывают с возможностью трансплантации производных ИПСК, поскольку эти клетки аутологичны предполагаемому донору, что позволяет избежать иммунологических реакций отторжения и способствует развитию и внедрению нового этапа современной медицины – эры персонализированной медицины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Культуральные среды, сыворотки, антибиотики, добавки

Среда F12 (Thermo Fisher Scientific), среда DMEM (Thermo Fisher Scientific), среда KnockOut DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific), среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific), среда Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific), среда Essential8 (Thermo Fisher Scientific), 50x добавка Essential8 (Thermo Fisher Scientific), среда mTeSR (STEMCELL Technologies), 5x добавка mTeSR (STEMCELL Technologies), эмбриональная бычья сыворотка FBS (Thermo Fisher Scientific), заменитель сыворотки KnockOut Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific), 100x бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific), 50x бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific), пенициллин/стрептомицин (Lonza), MycoZap Prophylactic (Lonza), раствор незаменимых аминокислот (Lonza), пируват натрия (Lonza), раствор GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 2- меркаптоэтанол (Sigma).

2.1.2. Факторы роста, низкомолекулярные активаторы/ингибиторы сигнальных путей

Основной фактор роста фибробластов bFGF (Thermo Fisher Scientific), инсулиноподобный фактор роста-1 IGF1 (PeptoTech), глиальный нейротрофический фактор GDNF (PeptoTech), цилиарный нейротрофический фактор CNTF (BioLegend), CHIR99021 (StemRD), SB431542 (Selleckchem), DMH1 (Tocris), Purmorphamin (Stemgent), Compound E (EMDMillipore), Y27632 (StemRD).

2.1.3. Реактивы

Бромистый этидий (Sigma), диметилсульфоксид – ДМСО (Sigma), желатин (Sigma), смесь dNTP (Синтол), агароза (AppliChem), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Serva), гидрокарбонат натрия (Sigma), ледяная уксусная кислота (Союзхимпром), Трис Ultra Pure (Медиген), Triton X-100 (Sigma), параформальдегид (ПФА) (Sigma), TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), хлороформ (Союзхимпром), этанол (Союзхимпром), изопропанол (Союзхимпром), CaryoMAX колцемид (Thermo Fisher Scientific), аскорбиновая кислота (Wako), ретиноевая кислота (Sigma), вальпроевая кислота (Sigma), митомицин С (Sigma), Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific), Corning Matrigel Matrix (Corning), TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific), oligo(dT)₁₅ Primer (Promega), DTT (Thermo Fisher Scientific), Naphtol phosphate N-5000 (Sigma), Fast Violet B Salt F-1631 (Sigma).

2.1.4. Ферменты

Обратная транскриптаза Super Script III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), эндонуклеазы рестрикции *BamHI*, *BglII*, *DraI*, *DdeI*, *HindIII* (NEB), Taq ДНК полимеразы, Dispace (Thermo Fisher Scientific), Collagenase IV (Thermo Fisher Scientific), Accutase (STEMCELL Technologies).

2.1.5. Наборы

TURBO DNA-free (Ambion), Zymoclean Gel DNA Recovery Kit - Capped columns (Zymo Research), набор для трансфекции фибробластов дермы человека (Lonza), набор OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB), набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол), набор для выделения плазмидной ДНК (БиоСилика).

2.1.6. Растворы и буферы

5x ОТ буфер (Thermo Fisher Scientific)

Десятикратный буфер для ДНК-полимеразы Taq №1 (166 mM (NH₄)₂SO₄; 650 mM Трис-НСl, рН 8,8; 0,1% Tween-20)

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (1 М NaH₂PO₄, 1 М Na₂HPO₄, рН 7,2) (Биолот)

ТАЕ буфер (40 mM Трис-НСl, рН 8,0, 20 mM ацетат натрия, 1 mM ЭДТА)

2.2. Методы

2.2.1. Методы работы с клеточными культурами

2.2.1.1. Состав сред и условия культивирования

Ростовая среда для фибробластов кожи человека

- 1) 44% среды F12 (Nutrient Mixture) (Thermo Fisher Scientific)
- 2) 44% среды DMEM (Dullbecco's Modified Eagle Medium) (Thermo Fisher Scientific)
- 3) 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific)
- 4) 2 mM GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific)
- 5) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza)
- 6) 0,1 mM раствор незаменимых аминокислот (Lonza)
- 7) 1 mM раствор пирувата натрия (Lonza)

Ростовая среда для ИПСК человека

- 1) 40% среды KnockOut DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific)
- 2) 15% заменитель сыворотки KnockOut Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific)

- 3) 2 mM GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific)
- 5) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza)
- 6) 0,1мМ раствор незаменимых аминокислот (Lonza)
- 7) 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma)
- 8) 500х раствор MycoZap Prophylactic (Lonza)
- 9) основной фактор роста фибробластов bFGF (10 нг/мл) (Thermo Fisher Scientific)

Среда N2B27

- 1) 95,5% среды DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific)
- 2) 100х бессывороточная добавка N2 (Thermo Fisher Scientific)
- 3) 50х бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific)
- 4) 2 mM GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific)
- 5) 0,1мМ раствор незаменимых аминокислот (Lonza)
- 6) 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma)
- 7) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza)
- 8) 500х раствор MycoZap Prophylactic (Lonza)
- 9) основной фактор роста фибробластов bFGF (100 нг/мл) (Thermo Fisher Scientific)

Нейральная среда

- 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) 50х бессывороточная добавка B27 (Thermo Fisher Scientific)
- 5) 2 mM GlutaMAX (L-аланил-L-глутамин дипептид в 0,85% растворе NaCl) (Thermo Fisher Scientific)
- 6) 100 ед/мл раствора пенициллин/стрептомицина (Lonza)
- 7) 0,1 мМ раствор аскорбиновой кислоты (Wako)

Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа. Пересев фибробластов и ИПСК производили каждые 3-5 дней в зависимости от плотности культуры. ИПСК, культивируемые на слое эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ), и пациент-специфичные фибробласты промывали фосфатно-солевым буферным раствором, после чего добавляли 1x заменитель трипсина TrypLE Express. Через 2-3 мин снимали клетки фосфатно-солевым буферным раствором, центрифугировали при 1000 оборотов/мин в течение 5 мин. Супернатант сливали, аккуратно ресуспендировали осадок в ростовой среде и переносили в культуральную емкость. При культивировании на ЭФМ поверхность предварительно обрабатывалась 0,1% раствором желатина в течение 10 мин при комнатной температуре. ИПСК, нейроэпителиальные предшественники и предшественники моторных нейронов, культивируемые на матриксе Matrigel, промывали средой DMEM/F-12, обрабатывали раствором Dispase (рабочая концентрация 1 мг/мл) в течение 3-5 мин. Затем снимали клетки средой DMEM/F-12, далее следовали процедуре описанной выше. Моторные нейроны обрабатывали ферментом Accutase, который инактивировали средой DMEM/F-12. При культивировании на матриксах Matrigel и Geltrex поверхность обрабатывалась согласно протоколам производителей.

2.2.1.2. Получение культур клеток

2.2.1.2.1. Получение ИПСК из фибробластов кожи человека

Репрограммирование фибробластов к плюрипотентному состоянию проводили согласно протоколам (Okita et al., 2011, Okita et al., 2013) с некоторыми изменениями. Общая схема репрограммирования представлена на Рисунке 5. Фибробласты кожи человека на ранних пассажах (меньше 8 пассажа) нуклеофицировали на приборе Nucleofector 2b Device (Lonza) согласно протоколу производителя набором из 6 эписомных векторов: pSE-

hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXВ-EBNA-1 (Addgene IDs #41855-58, #41813-14), обеспечивающих временную экспрессию факторов репрограммирования LIN28, OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, а также белков EBNA-1 и Trp53. При этом была использована программа P-022. Суммарное количество ДНК на реакцию составляло 3 мкг (по 500 нг каждой эписомы) на $4-5 \times 10^5$ клеток. После нуклеофекции клетки рассаживали на культуральную поверхность, покрытую матриксом Geltrex, в соотношении 1×10^5 на 100 мм чашку Петри в ростовую среду для фибробластов. На следующий день меняли среду на N2B27 и культивировали клетки в течение двух недель, смена среды производилась 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 в ростовую среду для ИПСК человека.

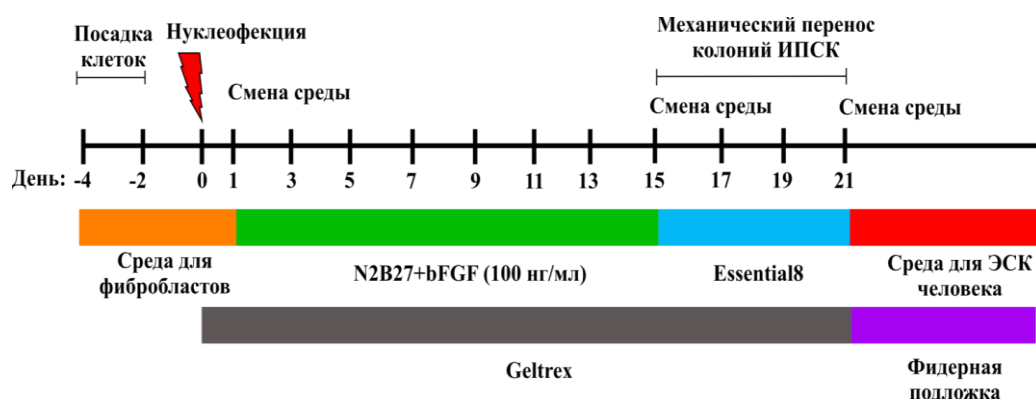


Рисунок 5. Общая схема репрограммирования фибробластов кожи человека к плюрипотентному состоянию.

2.2.1.2.2. Получение митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши

В качестве питающего субстрата для ИПСК использовали ЭФМ. Для остановки митотических делений монослой ЭФМ на 3-4 пассаже

обрабатывали раствором митомicina C в конечной концентрации 10 мкг/мл, в течение 2 ч, после чего клетки трижды отмывали раствором PBS. Снимали клетки раствором TrypLE Express, промывали раствором PBS и замораживали из расчета 50 см² и 25 см² на одну ампулу.

2.2.1.2.3. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны

Направленную дифференцировку ИПСК в моторные нейроны проводили согласно протоколу (Du et al., 2015), который включал пять этапов (Рисунок б). На первом этапе ИПСК сажали на матрикс Matrigel в среду mTeSR в соотношении 1:6-10. На следующий день меняли среду на нейтральную с добавлением 3 мкМ CHIR99021, 2 мкМ DMH1, 2 мкМ SB431542. На шестой день культивирования SOX1+/PAX6+ нейроэпителиальные предшественники пересаживали на Matrigel для запуска второго этапа дифференцировки в соотношении 1:2-4 в нейтральную среду с добавлением 1 мкМ CHIR99021, 2 мкМ DMH1, 2 мкМ SB431542, 0,1 мкМ ретиноевой кислоты и 0,5 мкМ Purmorphamin. На шестой день культивирования клетки пересаживали на Matrigel для запуска третьего этапа в соотношении 1:2-3 в нейтральную среду с добавлением 3 мкМ CHIR99021, 2 мкМ DMH1, 2 мкМ SB431542, 0,1 мкМ ретиноевой кислоты, 0,5 мкМ Purmorphamin и 0,5 мМ вальпроевой кислоты. Полученные OLIG2+ предшественники моторных нейронов культивировали в течение нескольких пассажей, при этом часть клеток замораживали. Четвертый этап дифференцировки включал культивирование OLIG2+ клеток в суспензии (на пластике, покрытом тонким слоем 1% агарозы) в нейтральной среде с добавлением 0,5 мкМ ретиноевой кислоты и 0,1 мкМ Purmorphamin. Через шесть дней моторные нейроны, экспрессирующие такие маркеры как HB9 и ISL1, диссоциировали до одноклеточного состояния и сажали на Matrigel в нейтральную среду с добавлением 0,5 мкМ ретиноевой кислоты, 0,1 мкМ Purmorphamin и 0,1 мкМ Compound E. Продолжительность заключительного этапа дифференцировки составляла десять дней.

При культивировании моторных нейронов в низкой плотности в среду добавляли нейротрофические факторы: IGF1, GDNF, CNTF в концентрации 10 нг/мл.

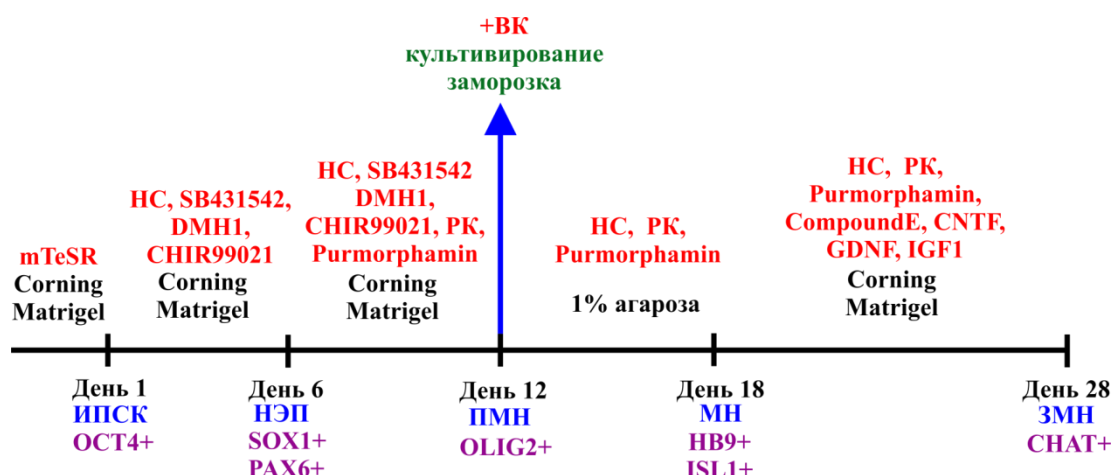


Рисунок 6. Схема дифференцировки ИПСК в моторные нейроны.

НЭП – нейроэпителиальные предшественники, ПМН – предшественники моторных нейронов, МН – моторные нейроны, ЗМН – зрелые моторные нейроны, РК – ретиноевая кислота, НС – нейральная среда.

2.2.1.3. Замораживание клеток

Для замораживания клетки снимали, как при пересадке, и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, супернатант сливали. Заморозку фибробластов проводили в растворе, содержащем 10% ДМСО, 40% FBS и 50% ростовой среды, заморозку ИПСК - 10% ДМСО и 90% заменителя сыворотки KnockOut Serum Replacement, заморозку OLIG2+ предшественников моторных нейронов - 10% ДМСО, 90% среды DMEM/F-12. Осадок ресуспендировали и переносили суспензию в ампулы для заморозки клеток. Ампулы с клетками помещали в кельвинатор на -70°C в специальных изопропанольных боксах, обеспечивающих постепенное охлаждение. Через сутки ампулы переносили в жидкий азот.

2.2.1.4. Размораживание клеток

Ампулы с клетками быстро размораживали при 37°C, помещали суспензию в коническую пробирку со средой DMEM/F-12, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, сливали супернатант, ресуспендировали клетки в ростовой среде и переносили в культуральную емкость.

2.2.2. Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы

Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы проводили согласно методу, описанному ранее (Pain et al., 1996). Удаляли ростовую среду из лунок с исследуемой культурой, промывали два раза буфером PBS и фиксировали клетки при помощи высушивания на воздухе 15–20 мин. Для выявления активности щелочной фосфатазы инкубировали зафиксированные клетки в растворе красителя: 100 мМ Tris-HCl pH 9,0; 100 мМ NaCl; 5 мМ MgCl₂; 0,4 мкг/мл Naphthol phosphate N-5000; 1 мкг/мл Fast Violet B Salt F-1631. Время инкубации составляло 10 мин (максимум 15–30 мин) в темноте при комнатной температуре. Затем промывали клетки буфером PBS и анализировали на микроскопе Nikon Eclipse TS100 с помощью программного обеспечения NIS-Elements D 4.12.00.

2.2.3. Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*

Монослой ИПСК на 100 мм чашках Петри на 4-5 день культивирования трижды промывали буфером PBS, добавляли 2 мл фермента Collagenase IV, растворенного в среде DMEM/F12 (рабочая концентрация 1 мкг/мл), и инкубировали при 37°C в течение 15-20 мин. Затем фермент инактивировали ростовой средой для фибробластов. Участки колоний аккуратно смывали

струей среды, центрифугировали при 1000 оборотов/мин в течение 5 мин. Супернатант сливали, аккуратно ресуспендировали осадок в ростовой среде для фибробластов и переносили в чашки Петри, покрытые 1% агарозой. Через 10-12 дней культивирования сформированные ЭТ дезагрегировали с помощью TrypLE Express и распластывали на поверхности, покрытой 0,1% желатином. В таком состоянии клетки наращивали до монослоя еще 1-2 недели.

2.2.4. Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vivo*

Спонтанная дифференцировка в системе *in vivo* производилась с помощью инъекции суспензии ИПСК иммунодефицитным мышам линии SCID в два сайта:

- 1) подкожно в область загривка из расчета 3-5 млн. клеток в 70 мкл матрикса Geltrex, растворенного в среде DMEM/F12 в соотношении 1:1;
- 2) внутримышечно в область голени из расчета 3-5 млн. клеток в 70 мкл ростовой среды для ИПСК человека и 1 млн. ЭФМ.

Через 6–8 недель животных выводили из эксперимента, а материал опухоли в месте введения извлекался и отправлялся на гистологический анализ. Для гистологического анализа из каждой опухоли отбирается по 3-4 независимых образца. Отбор материала был строго стандартизован. Образцы фиксировались в растворе Буэна и заключались в парафин стандартным способом. Срезы (7-10 мкм) обрабатывались по стандартной методике и окрашивались гематоксилин-эозином, а также готовыми наборами гистологических красителей производства компании Bio-Optica Milano S.P.A. (Italy): «Picro-Mallory trichromica» (04-021822), «Masson trichromica» (04-011802), «P.T.A.H.-hematoxyline» (04-060802), «Luxol fast blue Kreyer-Barrera» (04-200812), «Azan trichromica» (04-001802), «Picrofucsin Van Gizon» (04-030802), «Mucicarmine» (04-190812), «WVG long method» (04-051802), Изображения получали и анализировали на микроскопе «Axioscop2+»,

оснащённом CCD-камерой «AxioCam HRc» и программным пакетом «AxioVision», на базе ЦКП МАБО СО РАН.

2.2.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки дважды промывали PBS, фиксировали в 4% растворе формальдегида 15 мин, затем отмывали PBS два раза по 10 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 10 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 первыми антителами проводили при +4°C 16 ч, со вторыми антителами при комнатной температуре 1,5-2 ч. Первичные и вторичные антитела, использованные в данной работе приведены в Таблице 4. От несвязавшихся антител отмывали PBS два раза по 10 мин при комнатной температуре. Для общего окрашивания препаратов использовался DAPI. Анализ препаратов производили на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti с помощью программного обеспечения фирмы.

Таблица 4. Характеристика первичных и вторичных антител, используемых при иммунофлуоресцентном окрашивании

Антитела	Источник	Каталожный номер	Тип	Разведение
Первичные антитела				
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
Анти-TUJ1	Abcam	ab7751	Мыши моноклональные	1:100
Анти-NF200	Sigma	N4142	Кролика поликлональные	1:500
Анти-коллаген I	Abcam	ab34710	Кролика поликлональные	1:200
Анти-фибронектин	Abcam	ab23750	Кролика поликлональные	1:500
Анти-СК18	EMD Millipore	MAV3234	Мыши моноклональные	1:200
Анти- α SMA	DAKO	M0851	Мыши моноклональные	1:100
Анти-CD31	DAKO	IR610	Мыши моноклональные	1:200
Анти-SOX1	R&D Systems	AF3369	Козы поликлональные	1:500
Анти-PAX6	Santa Cruz Biotech	sc-81649	Мыши моноклональные	1:500
Анти-OLIG2	EMD Milipore	AB9610	Кролика поликлональные	1:500
Анти-HB9	DSBH	81.5C10	Мыши моноклональные	1:50
Анти-ISL1	Abcam	ab20670	Кролика поликлональные	1:500
Анти-MAP2	Abcam	ab5392	Курицы поликлональные	1:500
Анти-CHAT	EMD Milipore	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 IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11029	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG2a	Thermo Fisher Scientific	A21131	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor	Thermo Fisher	A21134	Козы	1:400

568 goat anti mouse IgG2a	Scientific		поликлональные	
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG1	Thermo Fisher Scientific	A21121	Козы поликлональные	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG3	Thermo Fisher Scientific	A21151	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
Alexa Fluor 568 rabbit anti goat IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	A11079	Кролика поликлональные	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti chicken IgY H&L	Abcam	ab150173	Козы поликлональные	1:400

2.2.6. Проточная цитофлуориметрия

Для подсчета количества GFP-позитивных клеток фибробласты с культуральной поверхности площадью не менее 10 см² снимали как при пересадке, ресуспендировали до одноклеточного состояния в 1 мл ростовой среды и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм. Подсчет производили на приборе BD FACSCanto II (BD Biosciences) согласно рекомендациям производителя.

2.2.7. Анализ кариотипа

Для фиксации использовали ИПСК на 3-4 сут после пересадки. За сут до фиксации клетки обрабатывали раствором TrypLE Express в течение 30 с, затем промывали несколько раз раствором PBS. За 4 ч до начала фиксации меняли среду на свежую. При этом добавляли CayoMAX колцемид из

расчета 10 мкл на 1 мл среды и этидиум бромид из расчета 10 мкл на 4 мл среды (исходная концентрация 1 мг/мл). При фиксации в суспензии клетки собирали в конические пробирки, стоящие на льду (при 0°C). Тщательно удаляли супернатант, добавляли в пробирку 3 мл гипотонического раствора (0,56% KCl). Держали 15–35 мин на водяной бане при 37°C. Время экспозиции варьировали в зависимости от культуры. Прикапывали 90–100 мкл фиксатора Карнуа (смесь метанол/уксусная кислота в объемном соотношении 3:1) при 4°C. Центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Удаляли супернатант, добавляли 1 мл фиксатора и оставляли на 20 мин при 0°C. Ресуспендировали, центрифугировали и проводили еще две смены фиксатора. После третьей смены фиксатора раскапывали суспензию клеток на холодные влажные стекла. Визуализировали метафазы под микроскопом.

При фиксации на чашке Петри удаляли среду из чашки, промывали раствором PBS, добавляли несколько капель TrypLE Express на 3–5 мин. Как только границы клеток в островках становились видны, добавляли 2–3 мл цитратного гипотонического раствора (0,2% цитрата натрия, 0,25% KCl) и оставляли на 20 мин при 37°C. Добавляли в чашку 1 мл префиксатора (6 мл гипотонического раствора, 170 мкл фиксатора Карнуа), оставляли при комнатной температуре на 2 мин. Процедуру повторяли 2 раза. Затем клетки аккуратно пипетировали, суспензию клеток переносили в пробирку, центрифугировали и далее процедуру фиксации проводили согласно вышеописанной методике.

G-окрашивание хромосом проводилось с помощью GTG-дифференциального метода. Фиксированные препараты “старели” тремя способами: выдерживали 3–5 сут в вакуумном эксикаторе при комнатной температуре, 1 ч при 80°C или 10–14 сут в темноте при комнатной температуре. Обработывали 0,06% раствором трипсина 30–35 с, после чего дважды споласкивали в 2х SSC и помещали на 1,5–2 мин в 5% раствор красителя Гимза. Далее препараты ополаскивали дистиллированной водой, высушивали и анализировали под световым микроскопом Axioscop 2 или

инвертированным световым микроскопом Axiovert 40. Раскладки хромосом метафазных пластинок полученных линий клеток проводили согласно стандартной методике.

2.2.8. Выделение РНК

РНК выделяли из культур клеток с помощью TRIzol Reagent согласно инструкции фирмы производителя. Осадок клеток, собранных с культуральной емкости, гомогенизировали пипетированием в 1 мл раствора TRIzol Reagent до полного лизиса. К лизату добавляли 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивали в течение 15 с и оставляли на 2-15 мин при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 11200 об/мин и 4°C. Верхнюю водную фазу с РНК переносили в чистую пробирку. Добавляли 0,5 мл 100% изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5-10 мин. РНК осаждали центрифугированием 10 мин при 11200 об/мин и 4°C. Супернатант отбирали, осадок РНК дважды промывали 75% этанолом, затем подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды. Для очистки образцов РНК от контаминаций ДНК использовали набор реагентов TURBO DNA-free. К полученному раствору РНК добавляли 0,1 объема 10×DNAaseI буфера, 2 ед. DNAaseI и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем к смеси добавляли 0,1 объема DNAase Inactivation Reagent, инкубировали 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин при 11500 об/мин. Супернатант, содержащий РНК, переносили в свежую пробирку и хранили при - 70°C.

2.2.9. Синтез кДНК методом обратной транскрипции

Для проведения одной реакции обратной транскрипции (20 мкл) смешивали

- 1) РНК – 2 мкг;
- 2) oligo(dT)₁₅ Primer (500 нг/мл) – 1 мкл;

3) dNTP (по 10 мМ каждого) – 1 мкл;

4) H₂O – до 13 мкл.

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

5) 5x First-Strand Buffer – 4 мкл;

6) DTT - 1 мкл;

6) обратная транскриптаза Surep Script III Reverse Transcriptase – 1 мкл (чтобы проверить образцы на контаминацию ДНК, ставили контрольную реакцию, в которую вместо фермента добавляли воду);

7) ингибитор РНКаз RNAsine – 1 мкл.

Смесь инкубировали 60 мин при 50°C, затем 15 мин при 70°C для инактивации обратной транскриптазы и хранили при -20°C.

2.2.10. Полимеразная цепная реакция

Для проведения одной реакции (25 мкл) смешивали:

1) смесь dNTP (10 мМ каждый) – 1 мкл;

2) 10x буфер для ДНК-полимеразы Taq №1 – 2,5 мкл;

3) MgCl₂ (25 мМ) – 3-6 мкл;

4) кДНК – 1 мкл;

5) ДНК-полимераза Taq (1 ед./мкл) – 0,5 мкл;

6) Праймеры (10 мМ каждый) – по 0,5 мкл;

7) H₂O – до 25 мкл.

Либо

1) OneTaq 2x Master Mix with Standard Buffer – 12,5 мкл;

2) Праймеры (10 мМ каждый) – по 0,5 мкл;

3) Геномная ДНК – 50-100 нг;

4) H₂O – до 25 мкл.

В пробирку с ДНК-матрицей и праймерами добавляли реакционную смесь, содержащую остальные компоненты, и помещали в амплификатор. Амплификацию проводили на приборе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Базовая программа для Taq полимеразы: 95°C – 5 мин, 35 циклов: 95°C – 30 с, 58-60°C – 30 с, 72°C – 30 с, далее 72°C – 5 мин. Базовая программа для OneTaq полимеразы: 94°C – 3 мин, 35 циклов: 94°C – 30 с, 58-60°C – 30 с, 68°C – 30 с, далее 68°C – 3 мин. Температуру отжига и время, в течение которого проходит один цикл, меняли в зависимости от размера продукта и особенностей праймеров. Более подробно условия ПЦР представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Список праймеров, используемых в работе

Ген	Последовательность олигонуклеотида (5'-3')	Название	Температура отжига, °C
<i>PAX6</i>	ACCCATTATCCAGATGTGTTTGCCCG AG	hPAX6-S1206	72
	ATGGTGAAGCTGGGCATAGGCGGCA G	hPAX6-AS1497	72
<i>GAPDH</i>	TGTTGCCATCAATGACCCCTT	hGAPDH-S	58
	CTCCACGACGTA CT CAGCG	hGAPDH-AS	58
<i>OCT3/4</i>	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	hOCT3/4-S1165	72
	CTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	hOCT3/4-AS1283	72
<i>SOX2</i>	GGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAG G	hSOX2-S1430	72
	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGT G	hSOX2-AS1555	72
<i>NANOG</i>	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC	hNANOG-S986	72
	CGGAAGATTCCAGTCGGGTTCACC	hNANOG-AS1334-	72
<i>MYC</i>	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAG C	hMYC-S253	72
	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCT G	hMYC-AS555	72
<i>KLF4</i>	ACGATCGTGGCCCCGGAAAAGGACC	hKLF4-S1128	72
	TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCT CC	hKLF4-AS1826	72

<i>GDF3</i>	CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG	hGDF3-S243	60
	GTGCCAACCCAGGTCCCGGAAGTT	hGDF3-AS850	60
<i>REX1</i>	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT	hREX1-RT-U	60
	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	hREX1-RT-L	60
<i>FGF4</i>	CTACAACGCCTACGAGTCCTACA	hFGF4-RT-U	60
	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG	hFGF4-RT-L	60
<i>BRACHYURY</i>	GCCCTCTCCCTCCCCTCCACGCACAG	hBRACHYURY-S1292	72
	CGGCGCCGTTGCTCACAGACCACAG G	hBRACHYURY-AS1540	72
<i>GFAP</i>	GGCCCGCCACTTGCAGGAGTACCAG G	hGFAP-S1040	72
	CTTCTGCTCGGGCCCCTCATGAGACG	hGFAP-AS1342	72
<i>FOXA2</i>	TGGGAGCGGTGAAGATGGAAGGGCA C	hFOXA2-S208	72
	TCATGCCAGCGCCCACGTACGACGA C	hFOXA2-AS398	72
<i>SOX17</i>	CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGAC G	hSOX17-S423	72
	TAGTTGGGGTGGTCCTGCATGTGCTG	hSOX17-AS583	72
<i>AFP</i>	GAATGCTGCAAACCTGACCACGCTGG AAC	hAFP-S948	72
	TGGCATTCAAGAGGGTTTTTCAGTCTG GA	hAFP-AS1201	72
<i>MAP2</i>	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGA GAGTG	hMAP2-S5401	72
	CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGT G	hMAP2-AS5587	72
<i>DNMT3B</i>	TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC	hDNMT3B-S2501	72
	TCCTTTCGAGCTCAGTGCACCACACA AAAC	hDNMT3B-AS2716	72
<i>TDGF1</i>	CTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTGC	hTDGF1-S490	72
	GCCACGAGGTGCTCATCCATCACAA GG	hTDGF1-AS700	72
<i>LEFTB</i>	CTTGGGGACTATGGAGCTCAGGGCG AC	hLEFTB-S797	72
	CATGGGCAGCGAGTCAGTCTCCGAG G	hLEFTB-AS1023	72
<i>NODAL</i>	GGGCAAGAGGCACCGTCGACATCA	hNODAL-S693	72
	GGGACTCGGTGGGGCTGGTAACGTT TC	hNODAL-AS900	72

<i>UTF1</i>	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	hUTF1-S832	72
	CGCGCTGCCCAGAATGAAGCCCAC	hUTF1-AS979	72
<i>PODXL</i>	TCCAGCCCCACAGCAGCATCAACTA CC	hPODXL-S1204	72
	CCGGGTTGAAGGTGGCTTTGACTGCT C	hPODXL-AS1403	72
<i>SMN1, SMN2</i>	AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA	R111	58
	CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT	X7-Dra	58
	GTAATAACCAAATGCAATGTGAA	541C960	58
	CTACAACACCCTTCTCACAG	541C1120	58
<i>FBX015</i>	GCCAGGAGGTCTTCGCTGTA	FBX015-RT-R	60
	AATGCACGGCTAGGGTCAAA	FBX015-RT-F	60
<i>EBNA-1</i>	ATCAGGGCCAAGACATAGAGATG	EBNA-1-RT-R	60
	GCCAATGCAACTTGGACGTT	EBNA-1-RT-F	60
<i>SMN2</i>	AATGCTTTTTTAACATCCATATAAAGC T	SMN F	58
	CCTTAATTTAAGGAATGTGAGCACC	SMN R	58
<i>HBB</i>	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	HBB F	60
	CCTTGATACCAACCTGCCCAG	HBB R	60

2.2.11. ПЦР в реальном времени для определения количества копий эписом на клетку

Для проведения одной реакции (20 мкл) смешивали:

- 1) 2,5х микс ПЦР-РВ – 8 мкл;
- 2) Праймеры (10 мМ каждый) – 0,5 мкл;
- 3) Матрица ДНК – 100 нг;
- 4) H₂O до 20 мкл.

Реакцию проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche) в течение 40 циклов. Каждый цикл состоял из двух стадий: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин. Для построения калибровочной кривой использовали следующие разведения стандарта (плазида рUC18 со встройкой 1 копии гена *FBX15* и *EBNA1*) – от

10^5 до 10^0 . В качестве референсного гена использовался ген *FBX15*. Анализ полученных данных проводили в программе LightCycler 480 SW 1.5 (Roche), Microsoft Excel 2013. Все ПЦР-реакции были повторены два раза. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы в реакцию добавляли H_2O .

2.2.12. Мультиплексная ПЦР в реальном времени для детекции количества копий гена *SMN2*

Во всех реакциях амплификации в качестве контроля была использована ДНК здорового индивидуума с тремя копиями гена *SMN1* и *SMN2* соответственно. В одном пробеге амплифицировали 200 нг, 100 нг, 50 нг и 10 нг контрольной ДНК. Каждый контрольный и исследуемый образец в одном эксперименте был амплифицирован дважды. В качестве референсного локуса был использован ген *HBB* (β -глобина). Каждый образец был проанализирован не менее 3 раз, были получены диапазоны значений для 2, 3 и 4 копий гена. Значения, полученные после ПЦР в реальном времени, представляют собой соотношение числа копий гена интереса и референсного гена β -глобина, который представлен в геноме в 2 копиях.

ПЦР проводили с использованием технологии TaqMan в термоциклере Rotor-Gene 3000 с 72-луночным ротором (Corbett Life Science). Реакция протекала в суммарном объеме реакционной смеси, равном 20 мкл, и включала 2 мкл 10-200 нг геномной ДНК, 1 мкл каждого праймера (Синтол) в концентрации 1 о.е./мкл, 2 мкл 2 мкМ *SMN1* или *SMN2* зонда (Applied Biosystems), 2 мкл 2 мкМ *HBB* зонда (Синтол), 2,5 мкл 2мМ смеси дезоксирибонуклеотидов (Fermentas, Литва), 2 мкл 25 мМ $MgCl_2$ (Силекс), 2 мкл 10х буфера для полимеразы (Силекс) и 0,3 мкл Taq-полимеразы (5 ед./мкл) (Силекс). Условия амплификации были следующие: предварительная денатурация $94^\circ C$ (10 мин), 40 циклов амплификации: $95^\circ C$ (20 с), $60^\circ C$ (1 мин). Показания флуоресценции детектировали после стадии отжига.

Последовательности зондов (Anhuf et al., 2003):

SMN1-Ex7-206T	FAM-CAGGGTTTCAGACAAA-MGB-BHQ1
SMN2-Ex7-anti	FAM-TGATTTTGTCTAAAACCC-MGB- BHQ1
HBB-402T	FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG- TAMRA

Данные анализировали с помощью Rotor-Gene version 6.1.71 Software. Были построены две калибровочные кривые для исследуемого и референсного гена методом линейной регрессии. Используя эти кривые, в каждом исследуемом образце была определена концентрация исследуемого и референсного гена. Далее, применив метод относительного количественного анализа (Relative Quantitation), считали относительную концентрацию для каждого образца. Полученное значение умножали на два (число копий гена *HBB*), чтобы получить число копий гена *SMN1* или *SMN2*.

2.2.13. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК разделяли в 1,5-3% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE с добавлением бромистого этидия (0,01 мкг/мл). В гель наносили образцы, содержащие 0,3-0,5 мкг ДНК, с добавлением 0,1 объема буфера, содержащего 15% фикола и 0,025% ксиленцианола. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 3-7 В/см. После электрофореза гель фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью Gel Doc XR+ System (BioRad).

2.2.14. Рестрикционный анализ

Для проведения одной реакции (50 мкл) смешивали:

Очищенный продукт ПЦР – не менее 500 нг;

10xCutSmart Buffer – 5 мкл;

Рестриктаза (*DraI*, *DdeI*) (15 ед/мкл) – 1 мкл;

H₂O – до 50 мкл.

Рестрикционную смесь оставляли на ночь при 37°C. Фрагменты ДНК разгоняли в 3% агарозном геле.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение оптимальной концентрации эписомной ДНК, используемой для репрограммирования

Определение оптимальной концентрации ДНК эписом, обеспечивающих экспрессию факторов репрограммирования, осуществлялось путем цитофлуориметрической оценки количества GFP-позитивных клеток через 48 ч после нуклеофекции фибробластов линии MA N1 эписомой pCE-GFP. Наибольшая эффективность нуклеофекции – 60% GFP-позитивных клеток, наблюдалась при использовании 3 мкг эписомной ДНК и режиме нуклеофекции P-022 (Рисунок 7). Достаточно высокий процент GFP-позитивных клеток обусловлен, помимо прочего, направленной доставкой oriP/EBNA-1 вектора в ядро и амплификацией эписом в течение двух сут после нуклеофекции (Yu et al., 2011).

Оптимальная концентрация эписомной ДНК в пересчете на общее количество клеток составила 6 пг на 1 клетку или 595 молекул на 1 клетку, что на 1 пг (около 100 молекул) больше, чем аналогичное значение, полученное при первом опубликованном использовании данного набора эписом (Okita et al., 2011). Однако мониторинг количества GFP-позитивных клеток в течение нескольких пассажей показал, что количество клеток, демонстрирующих экспрессию GFP, снижалось до 26,8% через 14 дней после нуклеофекции, затем до 13,8% через 21 день после нуклеофекции, а к 28 дню составляло 0,2-0,5%, что соответствует фоновому уровню.

Таким образом, несмотря на амплификацию эписомных векторов в клетке-реципиенте, обусловленную действием белкового продукта гена *EBNA-1*, с каждым пассажем происходит прогрессирующая элиминация эписомной ДНК. Однако время, в течение которого происходит элиминация, является достаточным для прохождения клеткой всех стадий репрограммирования (Okita et al., 2013).

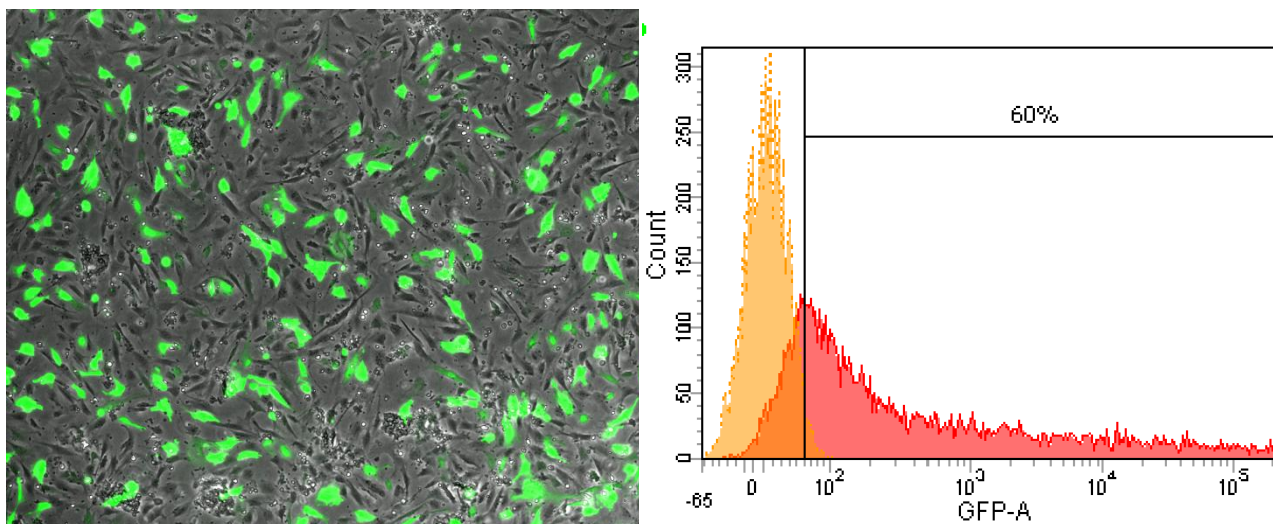


Рисунок 7. Оценка количества GFP-позитивных клеток через 48 ч после нуклеофекции фибробластов линии MA N1 контрольной эписомой pCE-GFP.

(А) Фибробласты человека линии MA N1 через 48 ч после нуклеофекции эписомой pCE-GFP. Совмещение: фазовый контраст и зеленый канал. Увеличение $\times 4$.

(Б) Количество GFP-позитивных клеток через 48 ч после нуклеофекции эписомой pCE-GFP, оцененное методом проточной цитофлуориметрии.

3.2. Репрограммирование пациент-специфичных фибробластов

В течение первой недели после нуклеофекции было отмечено изменение морфологии части фибробластов с тенденцией к уменьшению величины отростков. Такие клетки образовывали GFP-позитивные группы. Зеленый флуоресцентный белок в данном случае маркировал экспрессию одного из эписомных векторов pCE-GFP. В течение второй недели после нуклеофекции данные группы клеток продолжали менять морфологию, при этом была отмечена тенденция к формированию тесных контактов между клетками. На 3-4 неделе после нуклеофекции эписомами практически вся культуральная поверхность была покрыта монослоем из фибробластов, а также растущими над этим монослоем многочисленными колониями ИПСК. Для механического переноса на слой ЭФМ отбирали только те колонии ИПСК, которые имели наиболее выраженную ЭСК-подобную морфологию, размеры около 500 мкм и четкий ровный край. При этом выбор был ограничен двумя-

тремя десятками субклонов в силу технически сложного одновременного культивирования больших количеств линий ИПСК.

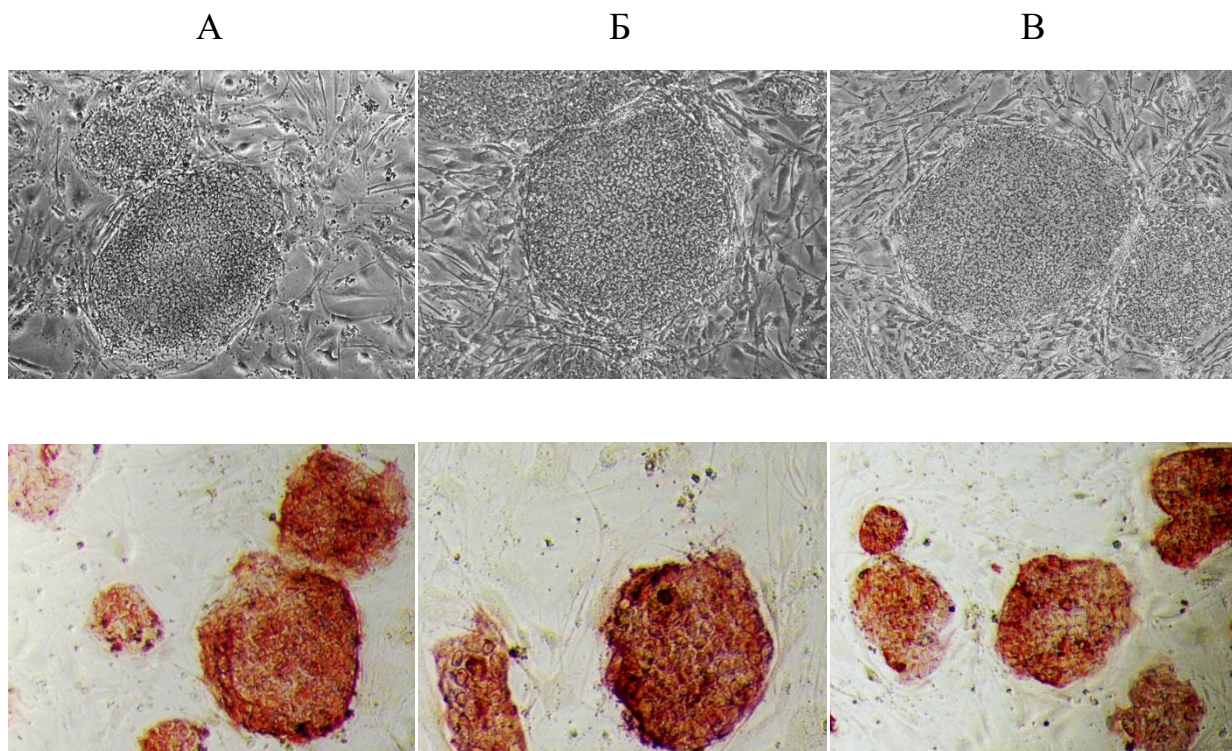


Рисунок 8. Морфология колоний ИПСК, полученных из пациент-специфичных фибробластов и окраска, демонстрирующая экспрессию щелочной фосфатазы.

(А) – линия iSMA 40, получена из фибробластов f1SMA от больного СМА I типа;

(Б) – линия m3SMA6, получена из фибробластов m3SMA от больного СМА II типа;

(В) – линия m34Sk10, получена из фибробластов m34Sk от здорового человека.

Увеличение x4.

В результате эксперимента по репрограммированию фибробластов линии f1SMA (от пациента со СМА I типа) было получено двадцать девять линий ИПСК (Таблица 6). В результате репрограммирования фибробластов линии m3SMA (от пациента со СМА II типа) и m34Sk (от здорового человека) было получено двадцать пять и семнадцать линий ИПСК, соответственно (Таблица 6).

Клетки всех полученных линий имели большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, интенсивно пролиферировали, росли

однослойными плоскими колониями, схожими по морфологии с ЭСК человека, и экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу (Рисунок 8).

Таблица 6. Линии ИПСК, полученные в результате репрограммирования фибробластов от больных СМА I и II типа и здорового человека.

Пациент	Линия фибробластов	Полученные линии ИПСК	Линии, взятые в анализ
СМА I типа	f1SMA	iSMA31, iSMA33, iSMA35, iSMA37, iSMA38, iSMA39, iSMA40, iSMA42, iSMA43, iSMA44, iSMA46, iSMA47, iSMA48, iSMA51, iSMA52, iSMA53, iSMA54, iSMA1L, iSMA2L, iSMA3L, iSMA4L, iSMA5L, iSMA6L, iSMA7L, iSMA8L, iSMA9L, iSMA10L, iSMA11L, iSMA12L.	iSMA37, iSMA40, iSMA6L.
СМА II типа	m3SMA	m3SMA1, m3SMA3, m3SMA4, m3SMA5, m3SMA6, m3SMA7, m3SMA9, m3SMA10, m3SMA11, m3SMA12, m3SMA13, m3SMA14, m3SMA17, m3SMA18, m3SMA20, m3SMA22, m3SMA23, m3SMA27, m3SMA28, m3SMA30, m3SMA31, m3SMAX, m3SMA2L, m3SMA3L, m3SMA4L.	m3SMA6, m3SMA13, m3SMA20.
Здоровый человек	m34Sk	m34Sk2, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk7, m34Sk8, m34Sk9, m34Sk10, m34Sk11, m34Sk12, m34Sk13, m34Sk14, m34Sk21, m34Sk22, m34Sk23, m34Sk26, m34Sk2L, m34Sk4L.	m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10, m34Sk13.

Далее из полученных субклонов отбирали по 6-7 линий ИПСК, которые демонстрировали наиболее стабильную ЭСК-подобную морфологию и имели оптимальные культуральные свойства. Остальные линии подвергались заморозке. Некоторые из отобранных линий в процессе культивирования меняли свою морфологию: контакты между клетками в колонии становились менее плотными, края колонии – менее отчетливыми. Такие линии также подвергались заморозке. Таким образом, для длительного культивирования и последующей характеристики были отобраны по три-четыре линии от

каждого пациента, характеризующиеся неизменной в течение длительного культивирования ЭСК-подобной морфологией и высокой пролиферативной активностью (пересадка 1:15-20 через каждые 3-5 дней) (Таблица 6).

Эффективность репрограммирования, оцененная как отношение количества колоний, положительно окрашивающихся на щелочную фосфатазу к исходному количеству клеток, составила ~0,1% (~ 100 колоний на 1×10^5 клеток). Полученные значения эффективности репрограммирования на порядок выше, чем аналогичные значения, полученные ранее при использовании данного набора эписом (Okita et al., 2011, Okita et al., 2013), и на несколько порядков выше, чем в первой опубликованной работе с использованием данного способа репрограммирования без интеграции трансгенов в геном (Yu et al., 2009). Большая эффективность, по всей вероятности, связана с большим количеством эписомной ДНК, приходящейся на одну клетку.

3.3. Профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности

С помощью ОТ-ПЦР была проанализирована транскрипция 13 генов, являющихся маркерами плюрипотентных стволовых клеток человека в 9 линиях ИПСК больных СМА и здорового человека. ЭСК человека линии HUES9 были взяты в качестве положительного контроля, а фибробласты в качестве отрицательного контроля. Было показано, что профиль экспрессии генов пациент-специфичных линий ИСПК в целом совпадает с таковым для ЭСК человека (Рисунок 9). В первую очередь, это касается экспрессии ключевых транскрипционных факторов, участвующих в установлении и поддержании самообновления и плюрипотентности, таких как *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLf4*, *MYC*. Также была показана транскрипция таких надежных маркеров плюрипотентных клеток, как *TDGF1*, *REX1*, *DNMT3B*, *UTF1*, *NODAL*, *LEFTB*, *FGF4*, *GDF3* и *PODXL*. Белковые продукты

перечисленных генов (Таблица 2) также принимают участие в установлении и поддержании плюрипотентного состояния клеток, как за счет регуляции транскрипции генов-мишеней, так и за счет стимуляции пролиферации, торможения апоптоза, установления соответствующих эпигенетических модификаций. Стоит отметить, что в исходных фибробластах линии f1SMA также была обнаружена экспрессия гена *PODXL*, кодирующего белок, участвующий в регуляции адгезивных свойств клеток (Debruin et al., 2014). По всей вероятности, экспрессия данного гена является особенностью данной линии фибробластов. Кроме того, в некоторых работах показано, что нокаут *PODXL* в ЭСК человека изменяет ряд свойств этих клеток, но не ведет к полной потере плюрипотентности (Freedman et al., 2015).

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что линии ИПСК, взятые в анализ, демонстрируют экспрессию основных маркеров плюрипотентных клеток, таких как поверхностные антигены SSEA4, TRA-1-60, транскрипционные факторы NANOG, OCT4 (Рисунок 10), SOX2 (Рисунок 9). TRA-1-60 – кератан сульфатированный протеогликан, обеспечивающий межклеточные взаимодействия. SSEA4 – гликолипид, также играющий важную роль в обеспечении адгезионных свойств плюрипотентных клеток. Данные маркеры клеточной поверхности ПСК человека по своим функциональным свойствам близки к белку *PODXL*.

В процентном отношении количество OCT4+ клеток в проанализированных линиях варьировало от 80% до 98%. При этом для получения адекватных результатов, особенно при длительном культивировании ИПСК и переходе на различные культуральные поверхности, оптимальное содержание OCT4+ клеток должно составлять более 95%. Увеличение процентного содержания OCT4 в общей популяции плюрипотентных клеток достигалось с помощью магнитного сортирования по поверхностному маркеру TRA-1-60.

Таким образом, с помощью двух различных методов была продемонстрирована экспрессия ключевых генов плюрипотентных клеток человека в полученных линиях ИПСК.

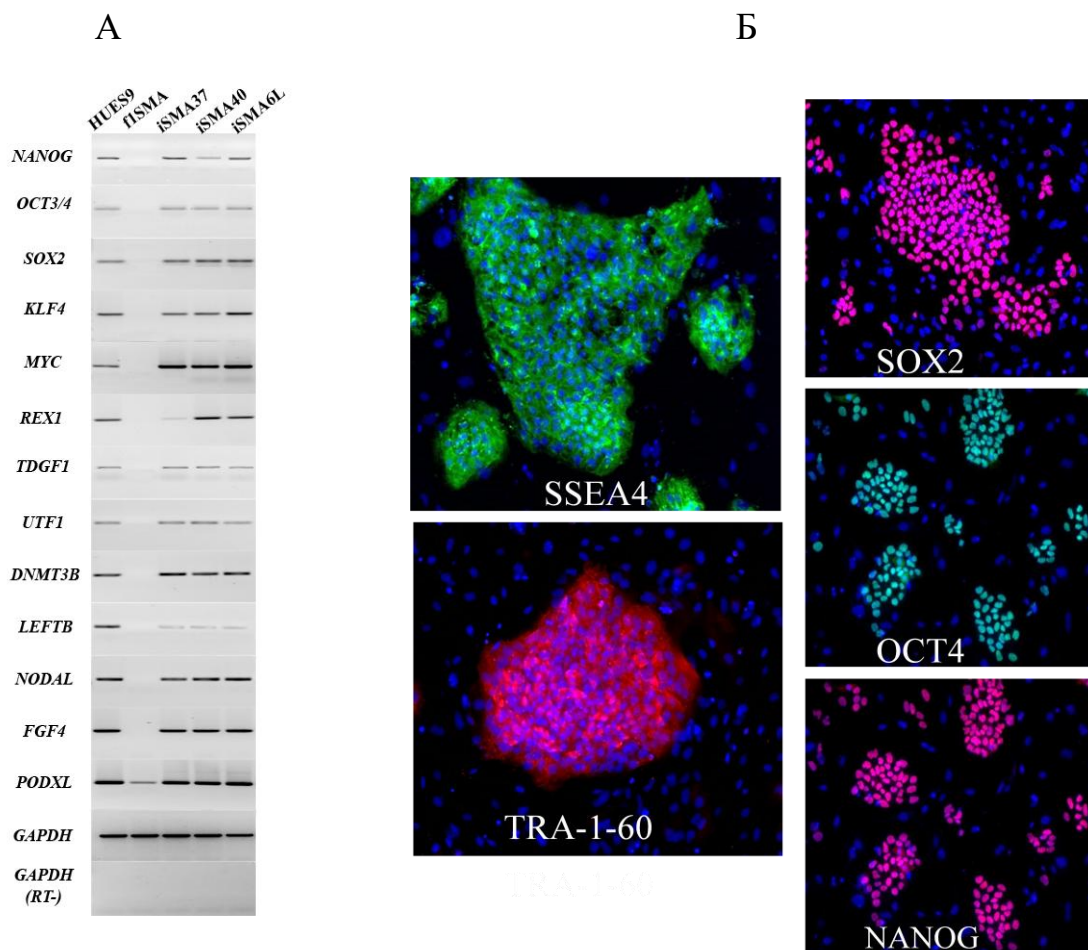


Рисунок 9. Анализ профиля экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности. Увеличение $\times 10$. Синим цветом окрашены ядра (DAPI).

(А) ОТ-ПЦР анализ транскрипции генов, являющихся маркерами плюрипотентных стволовых клеток человека в ЭСК (HUES9), фибробластах и трех линиях ИПСК: iSMA37, iSMA40 и iSMA6L.

(Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов OCT4, NANOG, SOX2, а также поверхностным антигенам SSEA4 и TRA-1-60 (линия iSMA40).

3.4. Спонтанная дифференцировка ИПСК в эмбрионидных тельцах

При культивировании полученных линий ИПСК в суспензии в отсутствие bFGF, необходимого для поддержания недифференцированного

состояния ПСК человека, наблюдается образование характерных структур - эмбрионидных телец, внутри которых происходят процессы интенсивной пролиферации и дифференцировки клеток (Рисунок 11).

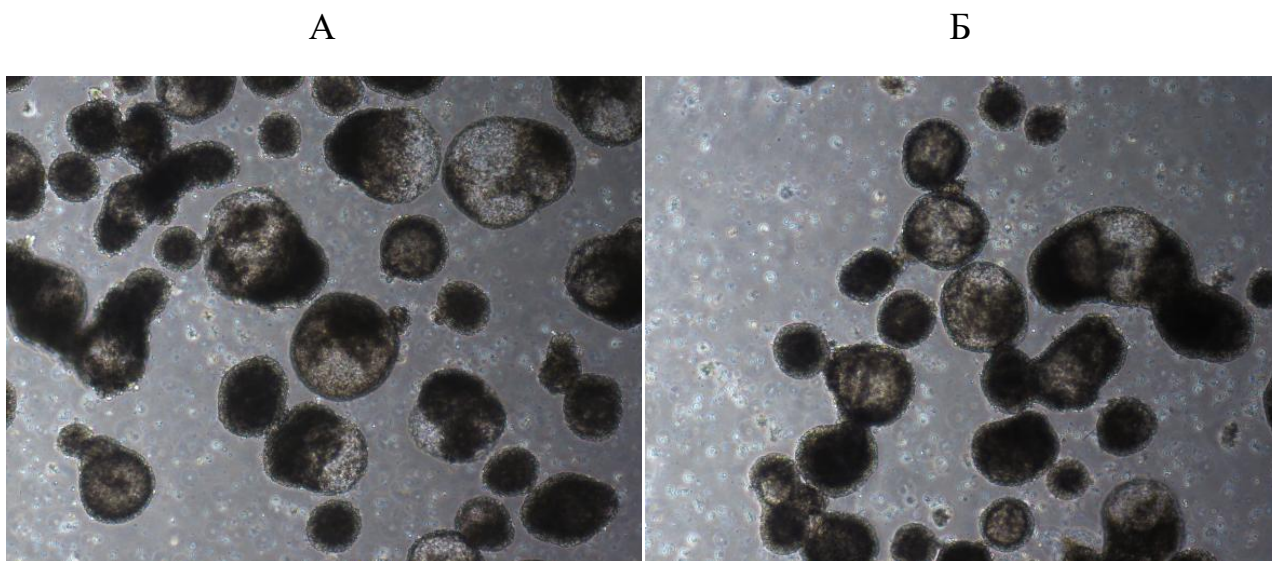


Рисунок 11. Эмбрионидные тельца, сформированные на 6 день культивирования из ИПСК линий iSMA37 (А) и iSMA6L (Б), в суспензии в среде без bFGF. Увеличение х4.

ОТ-ПЦР анализ клеток, полученных их распластанных эмбрионидных телец на 28 день культивирования, показал наличие маркеров производных трех зародышевых листков (Рисунок 12). В частности была показана экспрессия PAX6 – транскрипционного фактора нейроэктодермы, MAP2 – белка, участвующего в сборке микротрубочек при нейрогенезе, GFAP – маркера клеток нейроглии, BRACHYURY – транскрипционного фактора, обеспечивающего развитие клеток мезодермального происхождения, SOX17 и FOXA2 – транскрипционных факторов эндодермы, а также AFP – белка, активно экспрессирующегося в эмбриональной печени и эпителии кишечника.

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания также показана экспрессия маркеров производных эктодермы NF200 и TUJ1 – основных белков цитоскелета нервных клеток; мезодермы α SMA – одного из основных элементов сократительного аппарата гладкомышечных клеток, CD31 – поверхностного антигена эндотелиальных клеток, CD90 – поверхностного

антигена гематопоэтических стволовых клеток, коллагена I типа и фибронектина – основных компонентов межклеточного вещества соединительной ткани; эндодермы СК 18 – белка цитоскелета эпителия кишечной трубки (Рисунок 12, 13).

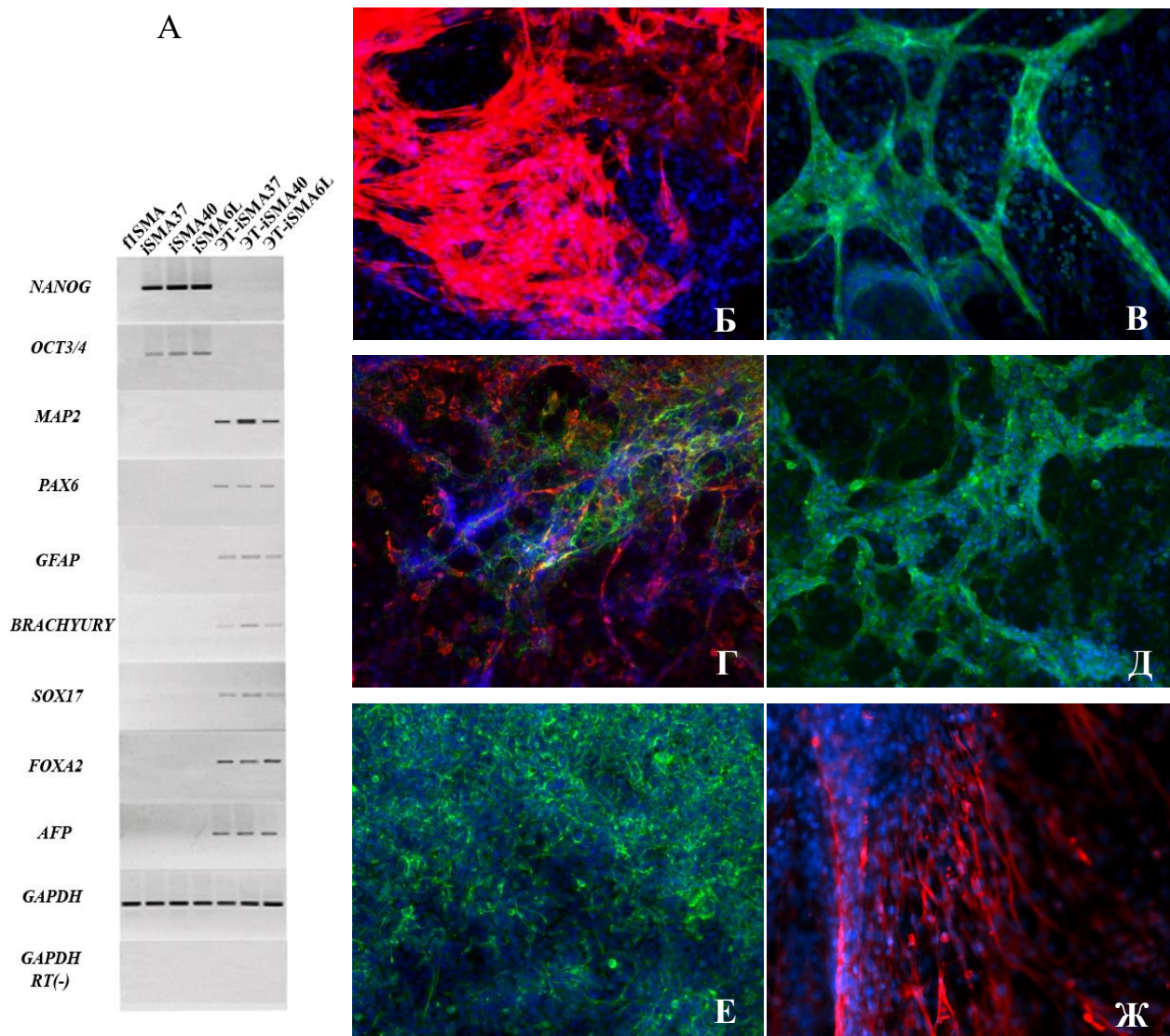


Рисунок 12. Экспрессия маркеров эктодермы, мезодермы и эндодермы при спонтанной дифференцировке ИПСК в эмбрионных тельцах.

(А) ОТ-ПЦР анализ транскрипции генов, являющихся маркерами производных трех зародышевых листков (экто-, мезо-, и эндодермы), при спонтанной дифференцировке ИПСК iSMA37, iSMA40 и iSMA6L.

Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию производных трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке ИПСК iSMA37, iSMA40 и iSMA6L: мезодермы α SMA (Б), CD31 (В'), коллаген I типа – красный, фибронектин – зеленый (Г) (совмещение); эндодермы СК18 (Д); эктодермы NF200 (Е), TUJ1 (Ж).

Увеличение $\times 4$. Синим окрашены ядра (DAPI).

Таким образом, плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки в системе *in vitro*.

3.5. Тератомный тест

Для линий ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 и m34Sk14 был проведен тест на дифференцировку *in vivo* – формирование тератом у иммунодефицитных мышей линии SCID. При этом были выбраны два способа введения – подкожно в загривок с Geltrex и внутримышечно в голень (Рисунок 14). В среднем в течение 7-8 недель в месте введения наблюдалось формирование опухолей (частота формирования - 70%), материал которых был направлен на гистологический анализ (Рисунок 15). Чаще всего однократная инъекция приводила к появлению единственной опухоли *in situ*. У некоторых опытных животных в результате подкожной (реже - глубокой внутримышечной) инъекции образовывались 2 или 3 независимые опухоли, также локализованные *in situ* (частота формирования - 15%).

По результатам гистологического анализа показано, что в тератомах, образованных после введения ИПСК линий iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 (Таблица 7) присутствуют основные диагностические морфотипы производных трех зародышевых листков – экто-, эндо-, и мезодермы.

После введения ИПСК линии m34Sk14 образовалась только одна опухоль *in situ*, гистологический анализ которой выявил наличие производных только одного зародышевого листка – мезодермы (Таблица 7). Таким образом, данная линия не прошла тератомный тест, что не позволяет однозначно судить о плюрипотентном статусе данной линии ИПСК.

В структуре изученных образцов тератом были обнаружены несколько клеточных ансамблей и ассоциаций, таких как разнообразные эпителиальные трубки, а также комплексы трубок с железистой тканью, комплексы хрящевой и костной ткани, костной и гемопоэтической ткани, костной и плотной соединительной ткани. Кроме того, отмечалась закладка целого

органа – эмбриональной кишки. Однако в данном эксперименте не было выявлено так называемых добавочных опухолей *ex situ* (лимфомы, саркомы и ряд других опухолей), что говорит о невысокой злокачественной активности исследованных линий ИПСК (Кизилова, 2016).

Таким образом, по результатам теста на спонтанную дифференцировку в системе *in vivo* было показано, что линии ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 образуют производные трех зародышевых листков, следовательно, можно сделать вывод о плюрипотентности данных клеточных линий.

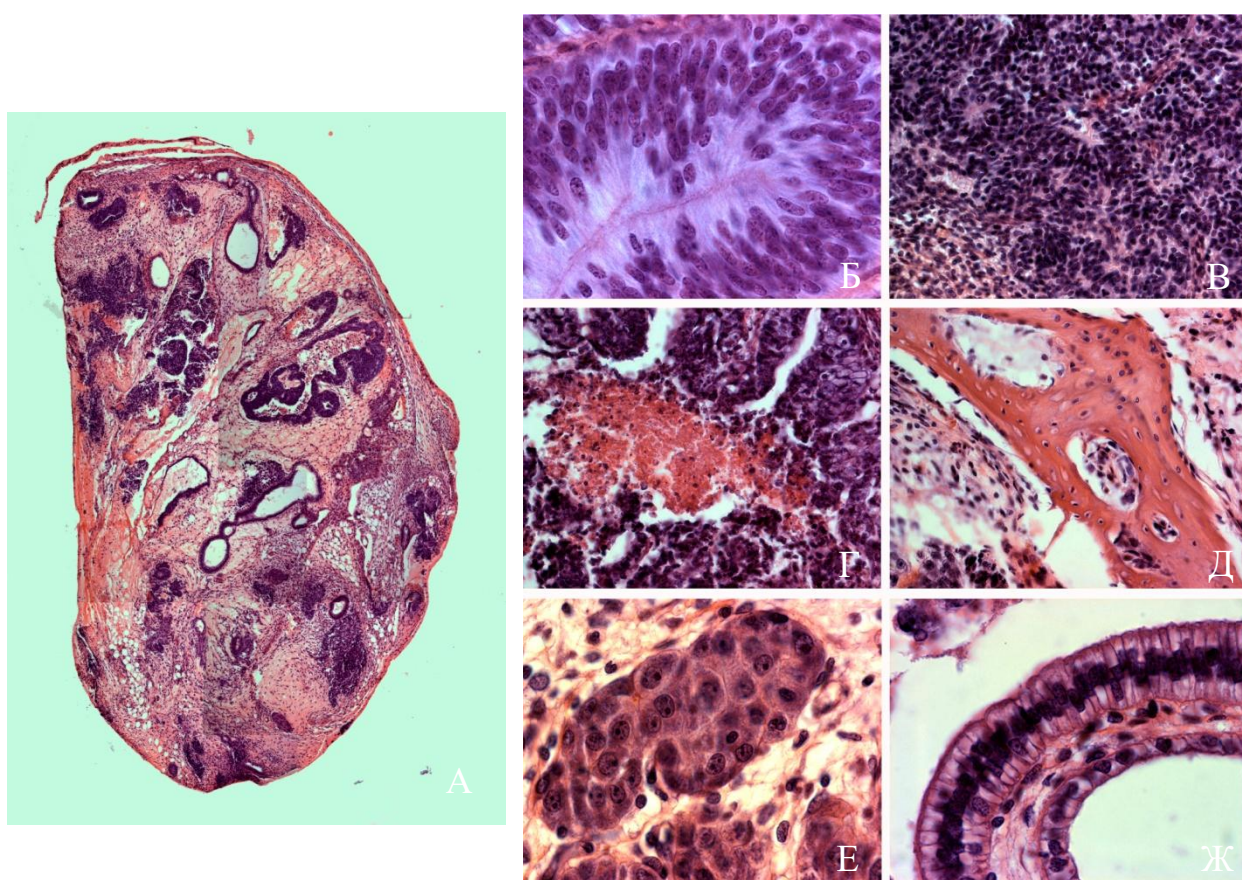


Рисунок 15. Результаты тератомного теста для линии ИПСК iSMA6L

(А) – Реконструкция общего вида тератомы. Увеличение x10.

(Б, В) – производные эктодермы: различные виды эмбрионального нейроэпителия, Увеличение x100 (Б), x20 (В).

(Г, Д) – производные мезодермы: очаг кроветворения (Г), костная ткань с очагом кроветворения (Д). Увеличение x20.

(Е, Ж) – производные энтодермы: островки гепатоцитов (Е), эпителий кишечной трубки (Ж). Увеличение x100.

Данные любезно предоставлены к.б.н., с.н.с. Кизиловой Е. А.

Таблица 7. Диагностические морфотипы, выявленные в ходе гистологического анализа тератом, сформированных после инъекции ИПСК линий iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 и m34Sk14 иммунодефицитным мышам. Желтым показаны производные эктодермы, зеленым – мезодермы, голубым – энтодермы, экстраэмбриональные производные в данной таблице не представлены.

Гистологический морфотип	Линия ИПСК				
	iSMA 6L	iSMA 40	m3SM A6	iSMA 37	m34S k14
эмбриональный нейроэпителий, эпителий нервной трубки, эмбриональная нейроэктодерма	+	+	+	+	
ранние производные нейроэпителия, нейробласты и спонгиобласты	+	+	+	+	
многослойный ороговевающий эпителий, многослойный неороговевающий эпителий слизистых покровов		+			
меланоциты	+	+	+	+	
плотная соединительная ткань, рыхлая соединительная ткань, эмбриональная мезенхимальная паренхима	+	+	+	+	+
хрящевая ткань	+	+	+	+	
костная ткань	+	+	+	+	
гладкомышечные волокна, изредка - миотубы поперечнополосатой мускулатуры	+	+	+	+	
жировая ткань	+	+	+	+	+
участки эритроцитопоза, участки гранулоцитопоза, возможно – участки мегакарицитопоза	+	+	+		
эпителиальные морфотипы разных отделов (средняя кишка) пищеварительной трубки, эпителии ворсинок	+	+	+	+	
железистые эпителии мерокринового типа секреции, сопутствующие кишечным эпителиям	+	+	+	+	
гепатоциты	+	+		+	

3.6. Кариотипирование полученных линий ИПСК

Анализ кариотипа показал, что 71,9% фибробластов линии f1SMA, использованной для репрограммирования, на 9 пассаже имеют нормальный кариотип 46, XX. Однако при длительном культивировании (несколько десятков пассажей) полученные ИПСК накапливают хромосомные нарушения, выявляемые рутинным кариотипированием. Так, линия ИПСК iSMA6L на 13 пассаже демонстрирует кариотип, близкий к норме – 70% клеток имеют кариотип 46, XX (Рисунок 16). На 30 пассаже только 30% клеток линии iSMA6L имеют нормальный кариотип. Около половины клеток линий iSMA37 и iSMA40 на 20 пассаже имеют хромосомные аномалии. При этом линия iSMA37 продемонстрировала наиболее нестабильный кариотип – на 30 пассаже практически все клетки являются анеуплоидными. Следовательно, для получения адекватных результатов при изучении клеточной модели СМА, необходимо использовать ИПСК на ранних пассажах культивирования.

Полученные результаты согласуются с данными о том, что при длительном культивировании ПСК человека и животных происходит накопление различных хромосомных аномалий (Martins-Taylor, Xu, 2012). Причем количество анеуплоидных клеток растет с увеличением пассажа, поскольку они, как правило, получают селективное преимущество перед клетками с нормальным кариотипом. Оно достигается за счет увеличения количества хромосом, несущих факторы роста и другие гены, обеспечивающие высокую пролиферативную активность и снижение уровня апоптоза. Показано, что в линиях ПСК преобладают такие хромосомные аномалии, как трисомия по 8,12,17 и 20 хромосомам, в линиях, имеющих генотип XX, – анеуплоидии по X-хромосоме (Ben-David et al., 2011, Laurent et al., 2011, Тааркен et al., 2011). Помимо грубых нарушений, плюрипотентные клетки способны накапливать мутации, которые невозможно выявить

рутинным кариотипированием, например однонуклеотидные замены, изменение числа копий генов и др. (Laurent et al., 2011, Martins-Taylor, Xu, 2012).

Анализ кариотипа линий, полученных в данной работе, показал, что обнаруженные хромосомные аномалии не затрагивают 5 хромосому, на которой находятся гены *SMN1* и *SMN2*. Кроме того, проанализированные линии ИПСК iSMA37, iSMA40 и iSMA6L достаточно эффективно формируют тератомы в тесте на дифференцировку в системе *in vivo*, что было бы невозможно при наличии грубых нарушений. Поэтому, учитывая проведенный анализ кариотипа, можно сделать вывод о том, что линии ИПСК, полученные в данной работе можно использовать для создания клеточной модели спинальной мышечной атрофии.

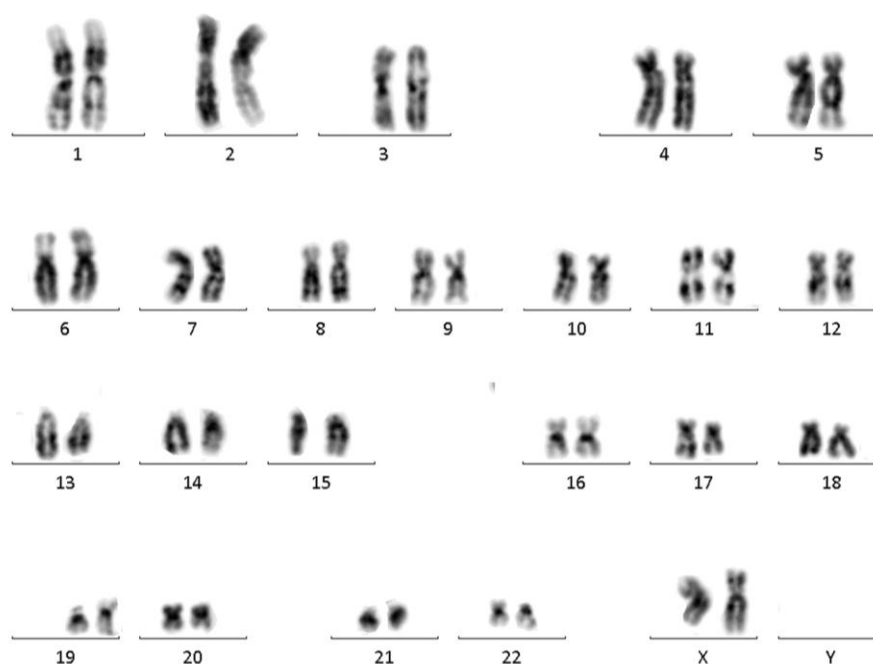


Рисунок 16. Кариотип ИПСК линии iSMA6L.
Данные любезно предоставлены к.б.н. Мининой Ю.В.

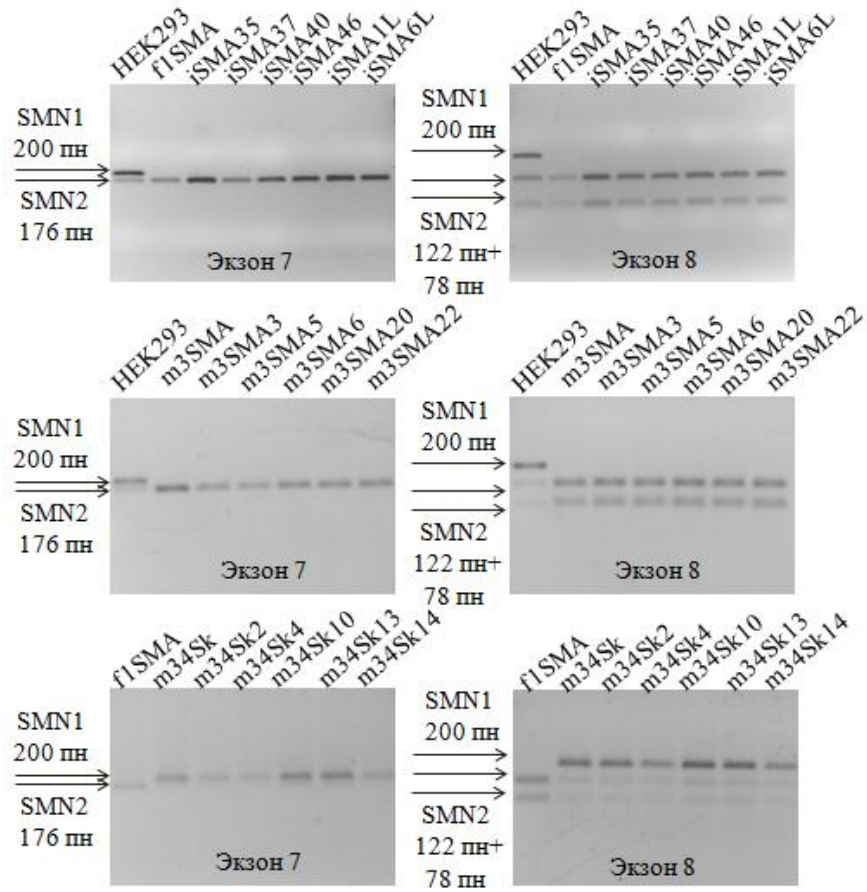
3.7. Характеристика генотипа пациент-специфичных ИПСК

С помощью ПЦР-ПДРФ было показано, что во всех линиях ИПСК, полученных от пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типов,

отсутствуют 7 и 8 экзоны гена *SMN1* (Рисунок 17). На электрофореze видны только продукты рестрикции гена *SMN2*. При этом линии ИПСК, полученные от здорового человека, в родословной которого отсутствовали родственники с заболеваниями двигательных нейронов, имеют нормальный генотип – видны продукты амплификации 7 и 8 экзонов как гена *SMN1*, так и *SMN2* (Рисунок 17). Использование данного метода диагностики спинальной мышечной атрофии являлось необходимым и достаточным условием для верификации генотипа в полученных клеточных линиях.

С помощью мультиплексной ПЦР в реальном времени было показано, что в линиях ИПСК, полученных от пациента со СМА I типа содержится 2 копии гена *SMN2*, в линиях ИПСК, полученных от пациента со СМА II типа – 3 копии *SMN2*, в линиях ИПСК, полученных от здорового человека – 1 копия *SMN2* (Рисунок 17). Представленные данные соответствуют наиболее распространенным генотипам СМА (McAndrew et al., 1997): 2 копии *SMN2* и гомозиготная делеция *SMN1* - наиболее распространенный генотип у пациентов со СМА I типа, 3 копии *SMN2* и делеция *SMN1* - наиболее распространенный генотип у пациентов со СМА II типа. Что касается нормального контроля, то полученные значения (1 копия *SMN2*) также не являются уникальными, поскольку у 5-9% здоровых людей вообще не обнаруживается гена *SMN2* (Gerard et al., 2000). Следовательно, ИПСК, полученные от данного пациента могут быть использованы в качестве нормального контроля при создании клеточной модели СМА.

А



Б

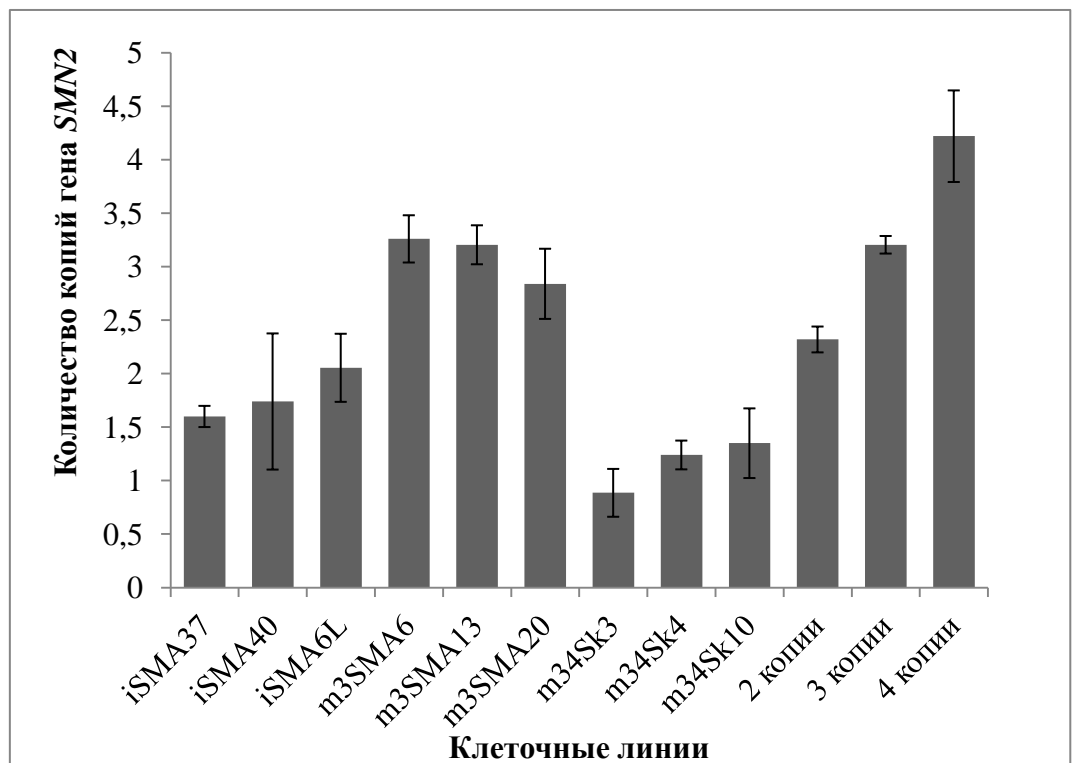


Рисунок 17. Характеристика генотипа пациент-специфичных ИПСК.

(А) ПЦР-ПДРФ анализ для выявления гомозиготной делеции 7 и 8 экзонов гена *SMN1*.

(Б) Результаты мультиплексной ПЦР в реальном времени по определению числа копий гена *SMN2*.

3.8. Анализ копийности эписом в полученных линиях ИПСК

Эписомные вектора pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXV-EBNA-1, используемые для репрограммирования к плюрипотентному состоянию, элиминируются из клеток при длительном культивировании. Данный процесс обусловлен сайленсингом промотора, запускающего транскрипцию гена *EBNA-1*, продукт которого отвечает за амплификацию эписом, и дефектами синтеза, что обеспечивает исчезновение данных молекул со скоростью примерно 5% на клеточный цикл в отсутствие каких-либо дополнительных манипуляций с культурой (Nanbo et al., 2007). Однако с определенной частотой данные вектора способны встраиваться в геном.

Поскольку количество эписомных векторов, приходящихся на 1 клетку при запуске репрограммирования, было на 100 копий больше, чем аналогичное значение при первом опубликованном использовании векторов pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXV-EBNA-1 (Okita et al., 2011), то вероятность встройки в данном эксперименте была повышена. Время, необходимое для элиминации эписом из клеток, также было увеличено: в работе Окиты с соавт. оно составило 80-120 дней (11-20 пассажей), в данном эксперименте требовалось минимум 120 дней (19-30 пассажей).

Для определения числа копий эписом на клетку была проведена количественная ПЦР в реальном времени с праймерами к гену *EBNA-1* (Рисунок 15). При этом в качестве гена домашнего хозяйства, по числу копий которого определялось количество клеток в экспериментальном образце, был выбран ген *FBX015*. Для построения калибровочной кривой использовался вектор, сконструированный на основе плазмиды pUC18 и содержащий по 1 копии генов *EBNA-1* и *FBX015*. Для проведения анализа ДНК выделялась из клеток, прошедших минимум 120 дней культивирования. При этом пассаж анализируемых культур варьировал от 19 до 28, так как имелись различия в

скорости роста линий ИПСК, полученных как из одного, так и из разных источников.

В качестве положительного контроля были взяты три линии фибробластов f1SMA, m3SMA и m34Sk, нуклеофецированных эписомами pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXВ-EBNA-1 в количестве 3 мкг. При этом ДНК из клеток выделяли на 6 день культивирования, что соответствует начальному этапу репрограммирования. Эписомные вектора активно амплифицировались в фибробластах линий f1SMA, m3SMA и m34Sk, было обнаружено свыше 1000 копий эписом на клетку (~1991, 1296 и 1455 копий на клетку, соответственно). Полученные значения на порядок больше, чем аналогичные значения, опубликованные в работе Окиты с соавт. (~200 копий на клетку). Вероятно, поэтому эффективность репрограммирования, достигнутая в данной работе, на порядок выше (0,1% против 0,01%).

Было показано, что в линии iSMA6L, полученной от пациента со СМА I типа, произошла встройка эписомы в геном (~ 2 копии на клетку) (Рисунок 18). В двух других линиях ИПСК, полученных из того же источника, iSMA37 и iSMA40 наблюдалась практически полная элиминация эписом (количество копий на клетку составило 0,001 и 0,002, соответственно).

В линии ИПСК m3SMA13, полученной от пациента со СМА II типа, показана полная элиминация эписом (Рисунок 18). В двух других линиях ИПСК, полученных из того же источника, m3SMA6 и m3SMA20 эписомы также элиминировались не полностью (0,005 и 0,084 копий на клетку, соответственно).

В линиях ИПСК m34Sk3, m34Sk4 и m34Sk10, полученных от здорового человека, показано наибольшее количество копий эписом на клетку (0,021; 0,054 и 0,334, соответственно) (Рисунок 18). Стоит отметить, что на время элиминации эписомных векторов из клеток влияет также скорость роста культуры. Чем медленнее делятся клетки, тем большее время требуется для исчезновения эписом. В случае линий m34Sk3, m34Sk4 и m34Sk10 скорость

роста была чуть ниже, чем для линий ИПСК, полученных от больных СМА. Возможно, поэтому для полного исчезновения использованных для репрограммирования векторов в данном случае требуется больше времени и, соответственно, больше пассажиров.

Вместе с тем следует принять во внимание тот факт, что анализируемые линии ИПСК являются субклонами, то есть потомками одной клетки. В результате нуклеофекции в каждую клетку попало разное количество эписом. Соответственно, если в клетку-предшественник линии ИПСК попало большее количество эписомных векторов, то вероятность встройки и время, необходимое для элиминации, в данном случае будут больше. Поэтому можно предположить, что в случае линии iSMA6L в клетку-предшественник было доставлено количество эписом большее среднего, и поэтому произошла встройка, а в случае m3SMA13 меньшее, но достаточное для успешного репрограммирования, и поэтому эписомы исчезли из клеток уже на 21 пассаже.

Таким образом, через 120 дней культивирования из девяти проанализированных линий ИПСК в одной (iSMA6L) была обнаружена встройка эписомного вектора, в одной (m3SMA13) - полная элиминация эписом, в трех (iSMA37, iSMA40, m3SMA6) - практически полная, в четырех (m3SMA20, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10) - частичная.

Остается спорным вопрос, можно ли использовать линию ИПСК iSMA6L со встройкой эписомы в геном для создания модели СМА. При использовании лентивирусов для репрограммирования к плюрипотентному состоянию встройка в геном является необходимым событием, однако в плюрипотентных клетках данные вектора инактивируются за счет транскрипционных факторов и модификаций хроматина (Hotta, Ellis, 2008, Minoguchi, Iba, 2008). Встройка эписомного вектора является гораздо более редким событием, однако инактивация в данном случае происходит, по всей вероятности, по аналогичному механизму (Okita et al., 2011). Кроме того, линия iSMA6L успешно прошла тесты по спонтанной дифференцировке в

эмбрионидных тельцах и в тератомах (100% формирование тератом), а также продемонстрировала эффективную дифференцировку в нейральном направлении (Григорьева, 2016). Учитывая вышеизложенное, можно допустить использование линии iSMA6L для создания модели СМА I типа.

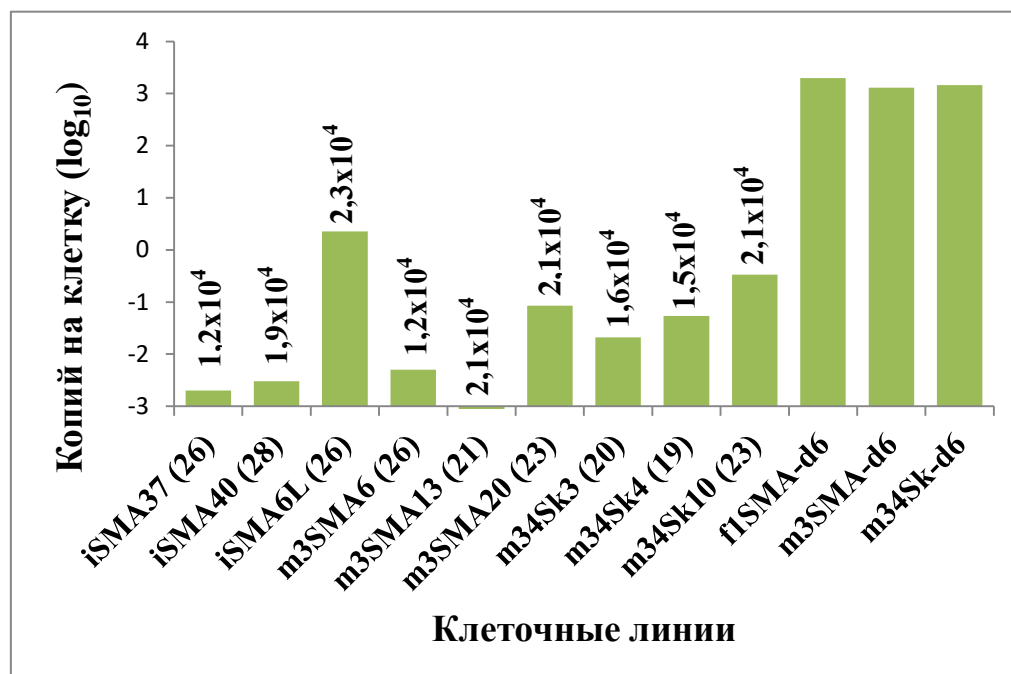


Рисунок 18. Результаты количественной ПЦР в реальном времени по определению числа копий эписом в линиях ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6, m3SMA13, m3SMA20, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10. Цифры над столбцами обозначают количество клеток в экспериментальном образце. В скобках указан пассаж проанализированных клеточных линий. f1SMA-d6, m3SMA-d6, m34Sk-d6 – положительный контроль (три линии фибробластов, используемых для репрограммирования к плюрипотентному состоянию, нуклеофецированные эписомами в количестве 3 мкг, на 6 день культивирования).

3.9. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны

ИПСК от пациентов со СМА и здорового человека запускали в дифференцировку параллельно. Было использовано по две линии от каждого пациента: iSMA37, iSMA40 от больного СМА I типа, m3SMA13 и m3SMA20 от больного СМА II типа, m34Sk3 и m34Sk10 от здорового человека. Выбор линии был обусловлен результатами проведенных тестов. Линии ИПСК, демонстрирующие в тесте на спонтанную дифференцировку *in vitro* тенденцию к преимущественному образованию нейральных производных,

были использованы в первую очередь. При этом ИПСК предварительно не адаптировали к культивированию на слое базальных белков Matrigel, а запускали в дифференцировку уже на следующий день после пересадки на Matrigel.

Все стадии нейральной дифференцировки от предшественников моторных нейронов до зрелых моторных нейронов были пройдены клетками разных линий с примерно одинаковой эффективностью. На стадии нейроэпителиальных предшественников показана экспрессия основного маркера данного типа клеток – транскрипционного фактора SOX1, а также транскрипционного фактора PAX6 (Рисунок 20). Среднее количество SOX1+ клеток на 9 день дифференцировки составило 90%, PAX6+ - 71% (Рисунок 19). Высокое содержание SOX1+ клеток свидетельствует о достаточно эффективной индукции дифференцировки в нейральном направлении. Более низкое процентное содержание PAX6+ клеток обусловлено тем, что данный транскрипционный фактор активно экспрессируется на более поздних стадиях дифференцировки, и, вероятно, не все клетки к 9 дню дифференцировки прошли данную стадию. Также, вероятно, часть клеток дифференцировалась в другом направлении – NKX2.2+ клеток, являющихся предшественниками интернейронов спинного мозга (Davis-Dusenbery et al., 2014).

На стадии предшественников моторных нейронов клетки демонстрировали экспрессию OLIG2 (Рисунок 20) – основного маркера данного клеточного типа. Причем на данной стадии дифференцировки клетки культивировали в течение нескольких пассажей, а также подвергали заморозке. При этом было показано, что экспрессия OLIG2 сохраняется на исходном уровне. Среднее количество OLIG2+ клеток на 18 день дифференцировки составило 54% (Рисунок 19). Полученное значение ниже, чем в исходном протоколе (Du et al., 2015). По всей вероятности, это обусловлено тем, что часть клеток дифференцировалась в другом направлении – IRX3+ клеток и NGN3+ клеток, являющихся

предшественниками нейронов другого типа, отличного от моторных нейронов спинного мозга (Davis-Dusenbery et al., 2014).

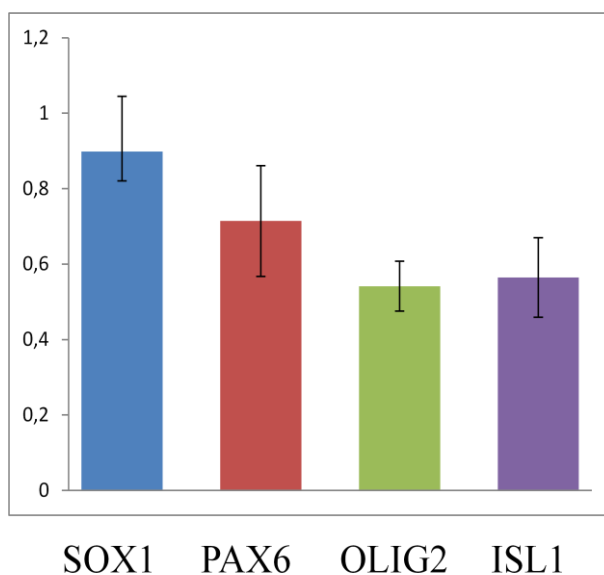


Рисунок 19. Относительное содержание SOX1+, PAX6+, OLIG2+, ISL1+ клеток на разных стадиях нейральной дифференцировки. Подсчет производился по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания, при этом были проанализированы результаты 3-х независимых повторностей, в каждой из которых было использовано не менее 6 случайных полей зрения. Для анализа использовалась программа ImageG.

На третьей неделе дифференцировки после прохождения стадии нейросфер клетки приобретали морфологию, характерную для моторных нейронов – тонкие длинные отростки, отходящие от тела, а также многочисленные сложные синапсы между клетками. Среднее количество ISL1+ клеток на 28 день дифференцировки составило 56% (Рисунок 19). Данный транскрипционный фактор, наряду с HB9 (Рисунок 20), ISL2, LHX3 является маркером моторных нейронов спинного мозга (Novitch et al., 2001). Количество ISL1+ моторных нейронов практически соответствует количеству OLIG2+ предшественников моторных нейронов. Отсюда можно сделать вывод, что заключительные этапы дифференцировки идут без значительных отклонений от исходного протокола. Однако количество моторных нейронов, полученных в данной работе значительно ниже, чем в исходном протоколе (Du et al., 2015), поскольку в процессе дифференцировки образуется смешанная популяция нейронов,

экспрессирующих неспецифические нейральные белки (MAP2, TUJ1, NF200), но отрицательно окрашивающихся антителами к ISL1 и HB9. Полученные отклонения могут быть связаны как с качественными особенностями исходных линий ИПСК, так и с условиями культивирования и использованными реагентами.

На заключительной стадии дифференцировки была показана экспрессия СНАТ (ацетилхолинтрансфераза) (Рисунок 20) – фермента, обеспечивающего биосинтез ацетилхолина, который является нейромедиатором, используемым для передачи нервного импульса моторными нейронами, т.е. осуществляющим нервно-мышечную передачу. Поэтому данный белок является маркером зрелых моторных нейронов, способных осуществлять свою основную функцию. Отростки зрелых моторных нейронов формируют между собой многочисленные синапсы. В участках формирования синапсов показана экспрессия белка SYNI (Рисунок 20). Данный белок является одним из основных структурных элементов синаптической мембраны и маркером зрелых функциональных синаптических контактов.

Также на стадии зрелых нейронов была отмечена сниженная жизнеспособность моторных нейронов, полученных из ИПСК пациента со СМА I типа по сравнению с контрольными линиями. Однако при добавлении в среду нейротрофических факторов выживаемость моторных нейронов повышалась.

Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что на поздних стадиях дифференцировки моторные нейроны от больных СМА демонстрируют патологические отклонения в фенотипе, характерные для данного заболевания (Ebert et al., 2009).

Таким образом, в результате направленной дифференцировки ИПСК от больных СМА I, II типа и здорового человека были получены моторные нейроны, экспрессирующие основные маркеры данного типа нервных клеток. При этом средняя эффективность дифференцировки составила 56%.

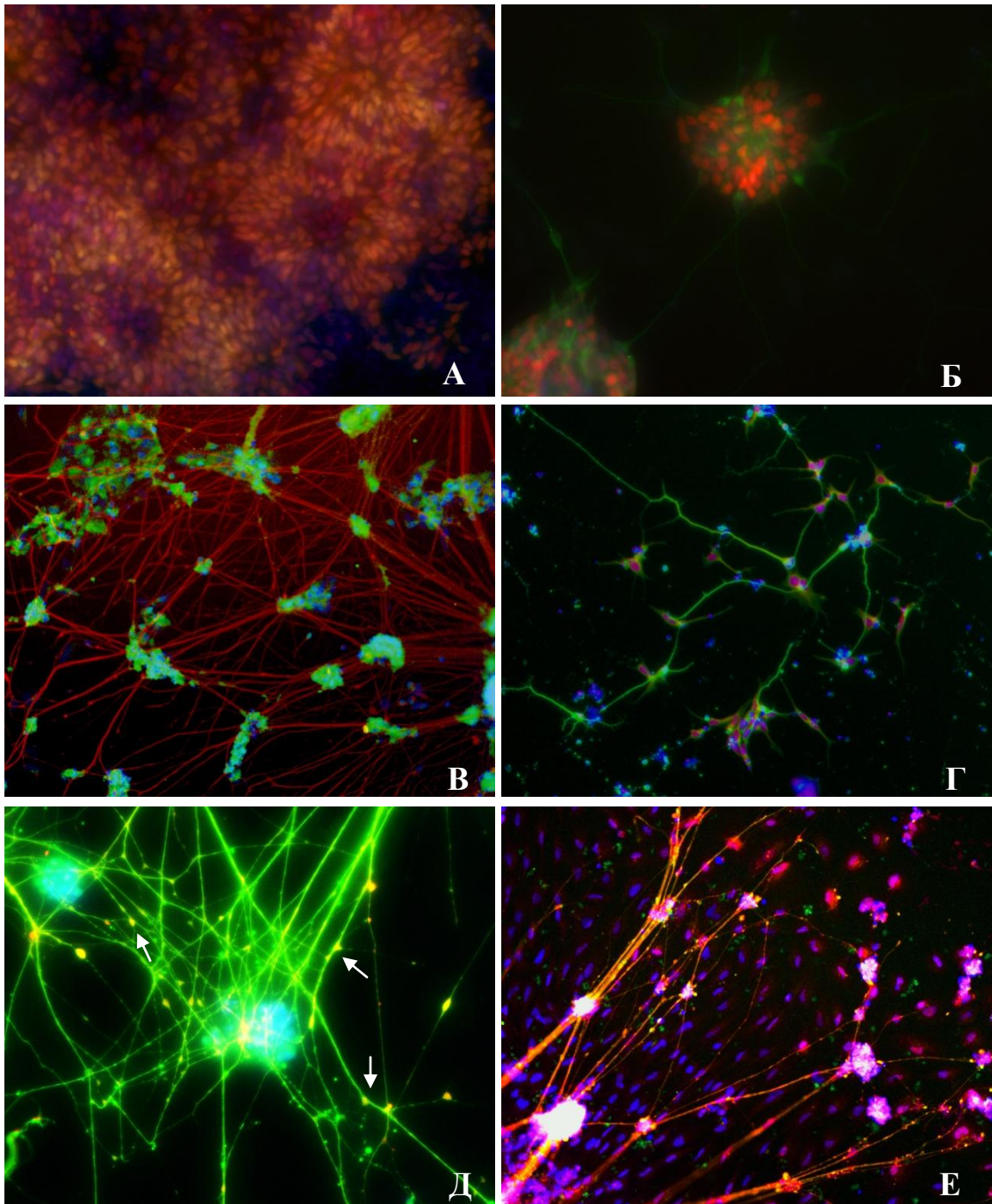


Рисунок 20. Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию нейральных маркеров. Синим окрашены ядра (DAPI).

(А) Совмещение: SOX1 – красный, PAX6 – зеленый; увеличение 20х.

(Б) OLIG2 – красный, TUJ1 – зеленый; увеличение 20х.

(В) Совмещение: HB9 – зеленый, NF200 – красный; увеличение 10х.

(Г) Совмещение: ISL1 – красный, TUJ1 – зеленый; увеличение 10х.

(Д) Совмещение: SYNI – красный, TUJ1 – зеленый, стрелками показана локализация синапсов; увеличение 20х.

(Е) Совмещение MAP2 – красный, CHAT – зеленый; увеличение 10х.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спинальная мышечная атрофия (СМА) - одно из наиболее распространенных наследственных нейродегенеративных заболеваний. Наиболее тяжелые формы СМА I и II типа манифестируют в раннем детском возрасте. Как и для большинства нейродегенеративных заболеваний, для СМА до сих пор не существует эффективного лечения, и больные вынуждены ограничиваться только различными поддерживающими терапевтическими методами. Такие больные нуждаются в квалифицированном уходе, специальных средствах гигиены и питания, а также респираторной поддержке. Все эти факторы в определенной степени могут продлить жизнь больного на некоторое время, но не улучшают ее качества.

Для выяснения патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели моторных нейронов при СМА, в настоящее время активно изучаются производные индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) больных СМА. Релевантность клеточных моделей, представленных моторными нейронами, демонстрирующими фенотип СМА, подтверждена во многих работах (Valetdinova et al., 2015). С помощью данных моделей обнаруживаются новые аспекты этиопатогенеза СМА (Liu et al., 2015, Xu et al., 2016), тестируются потенциальные лекарственные препараты (Ohuchi et al., 2016).

В представленной работе получена новая модельная система, состоящая из пациент-специфичных клеток больных СМА I, II типа и здорового человека. Полученные линии ИПСК успешно прошли тесты на плюрипотентность, включая тератомный тест – практически единственный способ проверки плюрипотентности стволовых клеток человека в условиях *in vivo*. Для получения моторных нейронов из ИПСК был использован наиболее современный подход, предполагающий эффективную направленную дифференцировку в сторону зрелых постмитотических двигательных

нейронов с помощью комбинации малых молекул, а также ингибитора сигнального пути NOTCH – Compound E.

Полученная модельная система послужит основой для исследования особенностей данного заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также для разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, скрининга больших панелей лекарственных соединений. Немаловажным преимуществом такой модели является возможность изучения ранних стадий развития заболевания в процессе дифференцировки предшественников в зрелые моторные нейроны. В таком формате возможно оптимизировать поиск соединений, препятствующих развитию СМА или замедляющих прогрессию данного заболевания на начальном этапе до наступления массовой гибели нейронов.

ВЫВОДЫ

1. В результате репрограммирования фибробластов с использованием эписомных векторов были получены линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов со СМА I, II типа и здорового человека.

2. Установлено, что полученные линии ИПСК имеют морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека, демонстрируют экспрессию щелочной фосфатазы и основных маркеров плюрипотентных клеток.

3. Показано, что при спонтанной дифференцировке полученных линий ИПСК в эмбрионидных тельцах образуются производные трех зародышевых листков.

4. Показано, что при спонтанной дифференцировке полученных линий ИПСК *in vivo* образуются производные трех зародышевых листков.

5. Обнаружено, что кариотип полученных линий ИПСК наиболее близок к норме на ранних пассажах культивирования, при длительном культивировании наблюдается увеличение количества анеуплоидных клеток.

6. Установлено, что соответствующие линии ИПСК имеют генотип больного СМА I типа: гомозиготная делеция 7 экзона гена *SMN1*, 2 копии гена *SMN2*, больного СМА II типа – делеция 7 экзона гена *SMN1*, 3 копии гена *SMN2*, здорового человека – отсутствие делеции в гене *SMN1*, 1 копия гена *SMN2*.

7. Через 120 дней культивирования из девяти проанализированных линий ИПСК в одной (iSMA6L) была обнаружена встройка эписомного вектора, в одной (m3SMA13) - полная элиминация эписом, в трех (iSMA37, iSMA40, m3SMA6) - практически полная, в четырех (m3SMA20, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10) - частичная.

8. Обнаружено, что направленная дифференцировка полученных линий ИПСК в моторные нейроны приводит к появлению клеток, демонстрирующих экспрессию основных маркеров двигательных нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P. W., Beighton G., Bello P. A., Benvenisty N., Berry L. S., Bevan S., Blum B., Brooking J., Chen K. G., Choo A. B., Churchill G. A., Corbel M., Damjanov I., Draper J. S., Dvorak P., Emanuelsson K., et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. // *Nat Biotechnol.* - 2007. - V. 25. - № 7. - P. 803-816.
2. Akten B., Kye M. J., Hao le T., Wertz M. H., Singh S., Nie D., Huang J., Merianda T. T., Twiss J. L., Beattie C. E., Steen J. A. and Sahin M. Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2011. - V. 108. - № 25. - P. 10337-10342.
3. Amemori T., Romanyuk N., Jendelova P., Herynek V., Turnovcova K., Prochazka P., Kapcalova M., Cocks G., Price J. and Sykova E. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. // *Stem Cell Res Ther.* - 2013. - V. 4. - № 3. - P. 68.
4. Amoroso M. W., Croft G. F., Williams D. J., O'Keeffe S., Carrasco M. A., Davis A. R., Roybon L., Oakley D. H., Maniatis T., Henderson C. E. and Wichterle H. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. // *J Neurosci.* - 2013. - V. 33. - № 2. - P. 574-586.
5. Anhuf D., Eggermann T., Rudnik-Schoneborn S. and Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. // *Hum Mutat.* - 2003. - V. 22. - № 1. - P. 74-78.
6. Arkblad E. L., Darin N., Berg K., Kimber E., Brandberg G., Lindberg C., Holmberg E., Tulinius M. and Nordling M. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. // *Neuromuscul Disord.* - 2006. - V. 16. - № 12. - P. 830-838.

7. Baccon J., Pellizzoni L., Rappsilber J., Mann M. and Dreyfuss G. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277. - № 35. - P. 31957-31962.
8. Ben-David U., Mayshar Y. and Benvenisty N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. // *Cell Stem Cell.* - 2011. - V. 9. - № 2. - P. 97-102.
9. Bernal S., Also-Rallo E., Martinez-Hernandez R., Alias L., Rodriguez-Alvarez F. J., Millan J. M., Hernandez-Chico C., Baiget M. and Tizzano E. F. Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) siblings. // *Neuromuscul Disord.* - 2011. - V. 21. - № 6. - P. 413-419.
10. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. // *Bioscience Horizons.* - 2010. - V. 3. - № 1. - P. 85-95.
11. Boon K. L., Xiao S., McWhorter M. L., Donn T., Wolf-Saxon E., Bohnsack M. T., Moens C. B. and Beattie C. E. Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. // *Hum Mol Genet.* - 2009. - V. 18. - № 19. - P. 3615-3625.
12. Boulisfane N., Choleza M., Rage F., Neel H., Soret J. and Bordonne R. Impaired minor tri-snRNP assembly generates differential splicing defects of U12-type introns in lymphoblasts derived from a type I SMA patient. // *Hum Mol Genet.* - 2011. - V. 20. - № 4. - P. 641-648.
13. Boulting G. L., Kiskinis E., Croft G. F., Amoroso M. W., Oakley D. H., Wainger B. J., Williams D. J., Kahler D. J., Yamaki M., Davidow L., Rodolfa C. T., Dimos J. T., Mikkilineni S., MacDermott A. B., Woolf C. J., Henderson C. E., Wichterle H. and Eggan K. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. // *Nat Biotechnol.* - 2011. - V. 29. - № 3. - P. 279-286.
14. Bradley A., Evans M., Kaufman M. H. and Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. // *Nature.* - 1984. - V. 309. - № 5965. - P. 255-256.

15. Brichta L., Hofmann Y., Hahnen E., Siebzehnrubl F. A., Raschke H., Blumcke I., Eyupoglu I. Y. and Wirth B. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet.* - 2003. - V. 12. - № 19. - P. 2481-2489.
16. Briese M., Esmaeili B., Fraboulet S., Burt E. C., Christodoulou S., Towers P. R., Davies K. E. and Sattelle D. B. Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. // *Hum Mol Genet.* - 2009. - V. 18. - № 1. - P. 97-104.
17. Burghes A. H. When is a deletion not a deletion? When it is converted. // *Am J Hum Genet.* - 1997. - V. 61. - № 1. - P. 9-15.
18. Burkhardt M. F., Martinez F. J., Wright S., Ramos C., Volfson D., Mason M., Garnes J., Dang V., Lievers J., Shoukat-Mumtaz U., Martinez R., Gai H., Blake R., Vaisberg E., Grskovic M., Johnson C., Irion S., Bright J., Cooper B., Nguyen L., et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. // *Mol Cell Neurosci.* - 2013. - V. 56. - №. - P. 355-364.
19. BurrIDGE P. W., Anderson D., Priddle H., Barbadillo Munoz M. D., Chamberlain S., Allegrucci C., Young L. E. and Denning C. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. // *Stem Cells.* - 2007. - V. 25. - № 4. - P. 929-938.
20. Butchbach M. E. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. // *Front Mol Biosci.* - 2016. - V. 3. - №. - P. 7.
21. Butchbach M. E., Edwards J. D. and Burghes A. H. Abnormal motor phenotype in the SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy. // *Neurobiol Dis.* - 2007. - V. 27. - № 2. - P. 207-219.
22. Carissimi C., Saieva L., Gabanella F. and Pellizzoni L. Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. // *J Biol Chem.* - 2006. - V. 281. - № 48. - P. 37009-37016.

23. Carrel T. L., McWhorter M. L., Workman E., Zhang H., Wolstencroft E. C., Lorson C., Bassell G. J., Burghes A. H. and Beattie C. E. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. // *J Neurosci.* - 2006. - V. 26. - № 43. - P. 11014-11022.
24. Cartegni L. and Krainer A. R. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. // *Nat Genet.* - 2002. - V. 30. - № 4. - P. 377-384.
25. Chambers S. M., Fasano C. A., Papapetrou E. P., Tomishima M., Sadelain M. and Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. // *Nat Biotechnol.* - 2009. - V. 27. - № 3. - P. 275-280.
26. Chambers S. M., Qi Y., Mica Y., Lee G., Zhang X. J., Niu L., Bilsland J., Cao L., Stevens E., Whiting P., Shi S. H. and Studer L. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. // *Nat Biotechnol.* - 2012. - V. 30. - № 7. - P. 715-720.
27. Chan Y. B., Miguel-Aliaga I., Franks C., Thomas N., Trulzsch B., Sattelle D. B., Davies K. E. and van den Heuvel M. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. // *Hum Mol Genet.* - 2003. - V. 12. - № 12. - P. 1367-1376.
28. Chang C. W., Lai Y. S., Pawlik K. M., Liu K., Sun C. W., Li C., Schoeb T. R. and Townes T. M. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells.* - 2009. - V. 27. - № 5. - P. 1042-1049.
29. Chang H. C., Dimlich D. N., Yokokura T., Mukherjee A., Kankel M. W., Sen A., Sridhar V., Fulga T. A., Hart A. C., Van Vactor D. and Artavanis-Tsakonas S. Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. // *PLoS One.* - 2008. - V. 3. - № 9. - e3209.
30. Chang T., Zheng W., Tsark W., Bates S., Huang H., Lin R. J. and Yee J. K. Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived

motoneurons of a spinal muscular atrophy patient. // *Stem Cells*. - 2011. - V. 29. - № 12. - P. 2090-2093.

31. Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R. A., Yong J., Shevchenko A., Mann M. and Dreyfuss G. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. // *J Cell Biol*. - 2000. - V. 148. - № 6. - P. 1177-1186.

32. Cheng L., Hansen N. F., Zhao L., Du Y., Zou C., Donovan F. X., Chou B. K., Zhou G., Li S., Dowey S. N., Ye Z., Program N. C. S., Chandrasekharappa S. C., Yang H., Mullikin J. C. and Liu P. P. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. // *Cell Stem Cell*. - 2012. - V. 10. - № 3. - P. 337-344.

33. Chin M. H., Mason M. J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiwu O., Richter L., Zhang J., Khvorostov I., Ott V., Grunstein M., Lavon N., Benvenisty N., Croce C. M., Clark A. T., Baxter T., Pyle A. D., Teitell M. A., et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. // *Cell Stem Cell*. - 2009. - V. 5. - № 1. - P. 111-123.

34. Cho H. J., Lee C. S., Kwon Y. W., Paek J. S., Lee S. H., Hur J., Lee E. J., Roh T. Y., Chu I. S., Leem S. H., Kim Y., Kang H. J., Park Y. B. and Kim H. S. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. // *Blood*. - 2010. - V. 116. - № 3. - P. 386-395.

35. Cifuentes-Diaz C., Frugier T., Tiziano F. D., Lacene E., Roblot N., Joshi V., Moreau M. H. and Melki J. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. // *J Cell Biol*. - 2001. - V. 152. - № 5. - P. 1107-1114.

36. Coovert D. D., Le T. T., McAndrew P. E., Strasswimmer J., Crawford T. O., Mendell J. R., Coulson S. E., Androphy E. J., Prior T. W. and Burghes A. H. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet*. - 1997. - V. 6. - № 8. - P. 1205-1214.

37. Coque E., Raoul C. and Bowerman M. ROCK inhibition as a therapy for spinal muscular atrophy: understanding the repercussions on multiple cellular targets. // *Front Neurosci.* - 2014. - V. 8. - №. - P. 271.
38. Corti S., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Nardini M., Ronchi D., Donadoni C., Salani S., Riboldi G., Magri F., Menozzi G., Bonaglia C., Rizzo F., Bresolin N. and Comi G. P. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. // *Sci Transl Med.* - 2012. - V. 4. - № 165. - 165ra162.
39. Cusco I., Barcelo M. J., del Rio E., Martin Y., Hernandez-Chico C., Bussaglia E., Baiget M. and Tizzano E. F. Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. // *Hum Genet.* - 2001. - V. 108. - № 3. - P. 222-229.
40. Cusco I., Lopez E., Soler-Botija C., Jesus Barcelo M., Baiget M. and Tizzano E. F. A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with c.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene. // *Hum Mutat.* - 2003. - V. 22. - № 2. - P. 136-143.
41. Cusin V., Clermont O., Gerard B., Chantereau D. and Elion J. Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. // *J Med Genet.* - 2003. - V. 40. - № 4. - e39.
42. Davis-Dusenbery B. N., Williams L. A., Klim J. R. and Eggan K. How to make spinal motor neurons. // *Development.* - 2014. - V. 141. - № 3. - P. 491-501.
43. Davis R. L., Weintraub H. and Lassar A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. // *Cell.* - 1987. - V. 51. - № 6. - P. 987-1000.
44. de Souza Godinho F. M., Bock H., Gheno T. C. and Saraiva-Pereira M. L. Molecular Analysis of Spinal Muscular Atrophy: A genotyping protocol based on TaqMan((R)) real-time PCR. // *Genet Mol Biol.* - 2012. - V. 35. - № 4 - P. 955-959.
45. Debruin E. J., Hughes M. R., Sina C., Lu A., Cait J., Jian Z., Lopez M., Lo B., Abraham T. and McNagny K. M. Podocalyxin regulates murine lung vascular

- permeability by altering endothelial cell adhesion. // PLoS One. - 2014. - V. 9. - № 10. - e108881.
46. DiDonato C. J., Ingraham S. E., Mendell J. R., Prior T. W., Lenard S., Moxley R. T., 3rd, Florence J. and Burghes A. H. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? // Ann Neurol. - 1997. - V. 41. - № 2. - P. 230-237.
47. Dolgin E. Putting stem cells to the test. // Nat Med. - 2010. - V. 16. - № 12. - P. 1354-1357.
48. Du Z. W., Chen H., Liu H., Lu J., Qian K., Huang C. L., Zhong X., Fan F. and Zhang S. C. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. // Nat Commun. - 2015. - V. 6. - №. - P. 6626.
49. Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. // Eur J Paediatr Neurol. - 1999. - V. 3. - № 2. - P. 49-51.
50. Ebert A. D., Yu J., Rose F. F., Jr., Mattis V. B., Lorson C. L., Thomson J. A. and Svendsen C. N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. // Nature. - 2009. - V. 457. - № 7227. - P. 277-280.
51. Edens B. M., Ajroud-Driss S., Ma L. and Ma Y. C. Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy. // Biochim Biophys Acta. - 2015. - V. 1852. - № 4. - P. 685-692.
52. Eggan K., Baldwin K., Tackett M., Osborne J., Gogos J., Chess A., Axel R. and Jaenisch R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. // Nature. - 2004. - V. 428. - № 6978. - P. 44-49.
53. Eggert C., Chari A., Laggerbauer B. and Fischer U. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. // Trends Mol Med. - 2006. - V. 12. - № 3. - P. 113-121.
54. Emery A. E. The nosology of the spinal muscular atrophies. // J Med Genet. - 1971. - V. 8. - № 4. - P. 481-495.
55. Esteban M. A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., Chen K., Li Y., Liu X., Xu J., Zhang S., Li F., He W., Labuda K., Song Y., Peterbauer A., et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and

- human induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 6. - № 1. - P. 71-79.
56. Fan L. and Simard L. R. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. // *Hum Mol Genet*. - 2002. - V. 11. - № 14. - P. 1605-1614.
57. Finkel R. S., McDermott M. P., Kaufmann P., Darras B. T., Chung W. K., Sproule D. M., Kang P. B., Foley A. R., Yang M. L., Martens W. B., Oskoui M., Glanzman A. M., Flickinger J., Montes J., Dunaway S., O'Hagen J., Quigley J., Riley S., Benton M., Ryan P. A., et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. // *Neurology*. - 2014. - V. 83. - № 9. - P. 810-817.
58. Freedman B. S., Brooks C. R., Lam A. Q., Fu H., Morizane R., Agrawal V., Saad A. F., Li M. K., Hughes M. R., Werff R. V., Peters D. T., Lu J., Baccei A., Siedlecki A. M., Valerius M. T., Musunuru K., McNagny K. M., Steinman T. I., Zhou J., Lerou P. H., et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. // *Nat Commun*. - 2015. - V. 6. - №. - P. 8715.
59. Frugier T., Nicole S., Cifuentes-Diaz C. and Melki J. The molecular bases of spinal muscular atrophy. // *Curr Opin Genet Dev*. - 2002. - V. 12. - № 3. - P. 294-298.
60. Frugier T., Tiziano F. D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M. and Melki J. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet*. - 2000. - V. 9. - № 5. - P. 849-858.
61. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K. and Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. - 2009. - V. 85. - № 8. - P. 348-362.
62. Gabanella F., Butchbach M. E., Saieva L., Carissimi C., Burghes A. H. and Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular

- atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. // *PLoS One*. - 2007. - V. 2. - № 9. - e921.
63. Gavrilina T. O., McGovern V. L., Workman E., Crawford T. O., Gogliotti R. G., DiDonato C. J., Monani U. R., Morris G. E. and Burghes A. H. Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. // *Hum Mol Genet*. - 2008. - V. 17. - № 8. - P. 1063-1075.
64. Gerard B., Ginet N., Matthijs G., Evrard P., Baumann C., Da Silva F., Gerard-Blanluet M., Mayer M., Grandchamp B. and Elion J. Genotype determination at the survival motor neuron locus in a normal population and SMA carriers using competitive PCR and primer extension. // *Hum Mutat*. - 2000. - V. 16. - № 3. - P. 253-263.
65. Giavazzi A., Setola V., Simonati A. and Battaglia G. Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. // *J Neuropathol Exp Neurol*. - 2006. - V. 65. - № 3. - P. 267-277.
66. Giovannini M. G., Casamenti F., Nistri A., Paoli F. and Pepeu G. Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. // *Br J Pharmacol*. - 1991. - V. 102. - № 2. - P. 363-368.
67. Gogliotti R. G., Quinlan K. A., Barlow C. B., Heier C. R., Heckman C. J. and DiDonato C. J. Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction. // *J Neurosci*. - 2012. - V. 32. - № 11. - P. 3818-3829.
68. Grigg G. W. Sequencing 5-methylcytosine residues by the bisulphite method. // *DNA Seq*. - 1996. - V. 6. - № 4. - P. 189-198.
69. Grimm M., Otter S., Peter C., Muller F., Chari A. and Fischer U. Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. // *Hum Mol Genet*. - 2005. - V. 14. - № 20. - P. 3099-3111.

70. Gubitza A. K., Mourelatos Z., Abel L., Rappsilber J., Mann M. and Dreyfuss G. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277. - № 7. - P. 5631-5636.
71. Guenther M. G., Frampton G. M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R. and Young R. A. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell.* - 2010. - V. 7. - № 2. - P. 249-257.
72. Gurdon J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. // *J Embryol Exp Morphol.* - 1962. - V. 10. - №. - P. 622-640.
73. Gurdon J. B., Byrne J. A. and Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2003. - V. 100. - P. 11819-11822.
74. Hafezparast M., Klocke R., Ruhrberg C., Marquardt A., Ahmad-Annuar A., Bowen S., Lalli G., Witherden A. S., Hummerich H., Nicholson S., Morgan P. J., Oozageer R., Priestley J. V., Averill S., King V. R., Ball S., Peters J., Toda T., Yamamoto A., Hiraoka Y., et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. // *Science.* - 2003. - V. 300. - № 5620. - P. 808-812.
75. Hansson J., Rafiee M. R., Reiland S., Polo J. M., Gehring J., Okawa S., Huber W., Hochedlinger K. and Krijgsveld J. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. // *Cell Rep.* - 2012. - V. 2. - № 6. - P. 1579-1592.
76. He S., Nakada D. and Morrison S. J. Mechanisms of stem cell self-renewal. // *Annu Rev Cell Dev Biol.* - 2009. - V. 25. - P. 377-406.
77. Hester M. E., Murtha M. J., Song S., Rao M., Miranda C. J., Meyer K., Tian J., Boulting G., Schaffer D. V., Zhu M. X., Pfaff S. L., Gage F. H. and Kaspar B. K. Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. // *Mol Ther.* - 2011. - V. 19. - № 10. - P. 1905-1912.

78. Hochedlinger K. and Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. // *Nature*. - 2002. - V. 415. - № 6875. - P. 1035-1038.
79. Hotta A. and Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. // *J Cell Biochem*. - 2008. - V. 105. - № 4. - P. 940-948.
80. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y. and Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. // *Science*. - 2013. - V. 341. - № 6146. - P. 651-654.
81. Hrdlickova R., Toloue M. and Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. - 2016.
82. Hsieh-Li H. M., Chang J. G., Jong Y. J., Wu M. H., Wang N. M., Tsai C. H. and Li H. A mouse model for spinal muscular atrophy. // *Nat Genet*. - 2000. - V. 24. - № 1. - P. 66-70.
83. Hu B. Y., Du Z. W. and Zhang S. C. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. // *Nat Protoc*. - 2009. - V. 4. - № 11. - P. 1614-1622.
84. Huang Y., Liang P., Liu D., Huang J. and Songyang Z. Telomere regulation in pluripotent stem cells. // *Protein Cell*. - 2014. - V. 5. - № 3. - P. 194-202.
85. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A. E. and Melton D. A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. // *Nat Biotechnol*. - 2008. - V. 26. - № 7. - P. 795-797.
86. Hunter G., Aghamaleky Sarvestany A., Roche S. L., Symes R. C. and Gillingwater T. H. SMN-dependent intrinsic defects in Schwann cells in mouse models of spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet*. - 2014. - V. 23. - № 9. - P. 2235-2250.
87. Ichida J. K., Blanchard J., Lam K., Son E. Y., Chung J. E., Egli D., Loh K. M., Carter A. C., Di Giorgio F. P., Koszka K., Huangfu D., Akutsu H., Liu D. R.,

- Rubin L. L. and Eggen K. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. // *Cell Stem Cell*. - 2009. - V. 5. - № 5. - P. 491-503.
88. Ieda M., Fu J. D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B. G. and Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. // *Cell*. - 2010. - V. 142. - № 3. - P. 375-386.
89. Imlach W. L., Beck E. S., Choi B. J., Lotti F., Pellizzoni L. and McCabe B. D. SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*. // *Cell*. - 2012. - V. 151. - № 2. - P. 427-439.
90. Inanami O., Meguro K., Ohno K. and Sato A. Contribution of cholinergic vasodilators on the increase in cerebral cortical blood flow responses to the intravenous administration of thyrotropin releasing hormone in anesthetized rats. // *Neurosci Lett*. - 1988. - V. 88. - № 2. - P. 184-188.
91. Iwasaki Y., Ikeda K., Shiojima T. and Kinoshita M. TRH analogue, TA-0910 (3-methyl-(s)-5,6-dihydroorotyl-L-histidyl-L-prolinamide) enhances neurite outgrowth in rat embryo ventral spinal cord in vitro. // *J Neurol Sci*. - 1992. - V. 112. - № 1-2. - P. 147-151.
92. Jablonka S., Karle K., Sandner B., Andreassi C., von Au K. and Sendtner M. Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet*. - 2006. - V. 15. - № 3. - P. 511-518.
93. Jackson I. M. Thyrotropin-releasing hormone. // *N Engl J Med*. - 1982. - V. 306. - № 3. - P. 145-155.
94. Jia F., Wilson K. D., Sun N., Gupta D. M., Huang M., Li Z., Panetta N. J., Chen Z. Y., Robbins R. C., Kay M. A., Longaker M. T. and Wu J. C. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. // *Nat Methods*. - 2010. - V. 7. - № 3. - P. 197-199.
95. Joannides A. J., Fiore-Herliche C., Battersby A. A., Athauda-Arachchi P., Bouhon I. A., Williams L., Westmore K., Kemp P. J., Compston A., Allen N. D. and Chandran S. A scaleable and defined system for generating neural stem cells

from human embryonic stem cells. // *Stem Cells*. - 2007. - V. 25. - № 3. - P. 731-737.

96. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P. and Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. // *Nature*. - 2009. - V. 458. - № 7239. - P. 771-775.

97. Kariya S., Obis T., Garone C., Akay T., Sera F., Iwata S., Homma S. and Monani U. R. Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation. // *J Clin Invest*. - 2014. - V. 124. - № 2. - P. 785-800.

98. Karumbayaram S., Novitch B. G., Patterson M., Umbach J. A., Richter L., Lindgren A., Conway A. E., Clark A. T., Goldman S. A., Plath K., Wiedau-Pazos M., Kornblum H. I. and Lowry W. E. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. // *Stem Cells*. - 2009. - V. 27. - № 4. - P. 806-811.

99. Kashima T. and Manley J. L. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. // *Nat Genet*. - 2003. - V. 34. - № 4. - P. 460-463.

100. Kelly S. J. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. // *J Exp Zool*. - 1977. - V. 200. - № 3. - P. 365-376.

101. Kim D., Kim C. H., Moon J. I., Chung Y. G., Chang M. Y., Han B. S., Ko S., Yang E., Cha K. Y., Lanza R. and Kim K. S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. // *Cell Stem Cell*. - 2009. - V. 4. - № 6. - P. 472-476.

102. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L. and Shay J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. // *Science*. - 1994. - V. 266. - № 5193. - P. 2011-2015.

103. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. // *J Hum Genet*. - 2013. - V. 58. - № 7. - P. 439-445.

104. King T. J. and Briggs R. Changes in the Nuclei of Differentiating Gastrula Cells, as Demonstrated by Nuclear Transplantation. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1955. - V. 41. - № 5. - P. 321-325.
105. Kolb S. J. and Kissel J. T. Spinal Muscular Atrophy. // *Neurol Clin.* - 2015. - V. 33. - № 4. - P. 831-846.
106. Koo K. B., Suh H. J., Ra K. S. and Choi J. W. Protective effect of cyclo(his-pro) on streptozotocin-induced cytotoxicity and apoptosis in vitro. // *J Microbiol Biotechnol.* - 2011. - V. 21. - № 2. - P. 218-227.
107. Kuo J. J., Siddique T., Fu R. and Heckman C. J. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. // *J Physiol.* - 2005. - V. 563(Pt 3). - P. 843-854.
108. Laiosa C. V., Stadtfeld M., Xie H., de Andres-Aguayo L. and Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. // *Immunity.* - 2006. - V. 25. - № 5. - P. 731-744.
109. Lamot L., Vidovic M., Perica M., Bukovac L. T. and Harjacek M. [Microarray and Gene Expression Analysis]. // *Lijec Vjesn.* - 2015. - V. 137. - № 5-6. - P. 188-195.
110. Laurent L. C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morey R., Lynch C., Harness J. V., Lee S., Barrero M. J., Ku S., Martynova M., Semechkin R., Galat V., Gottesfeld J., Izpisua Belmonte J. C., Murry C., Keirstead H. S., Park H. S., Schmidt U., et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. // *Cell Stem Cell.* - 2011. - V. 8. - № 1. - P. 106-118.
111. Le T. T., Pham L. T., Butchbach M. E., Zhang H. L., Monani U. R., Coover D. D., Gavrilina T. O., Xing L., Bassell G. J. and Burghes A. H. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. // *Hum Mol Genet.* - 2005. - V. 14. - № 6. - P. 845-857.

112. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. and et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. // *Cell*. - 1995. - V. 80. - № 1. - P. 155-165.
113. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G. and Melki J. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. // *Nat Genet*. - 1997. - V. 16. - № 3. - P. 265-269.
114. Li J., Ishii T., Feinstein P. and Mombaerts P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. // *Nature*. - 2004. - V. 428. - № 6981. - P. 393-399.
115. Li W. and Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. // *Trends Pharmacol Sci*. - 2010. - V. 31. - № 1. - P. 36-45.
116. Lin T., Ambasudhan R., Yuan X., Li W., Hilcove S., Abujarour R., Lin X., Hahm H. S., Hao E., Hayek A. and Ding S. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. // *Nat Methods*. - 2009. - V. 6. - № 11. - P. 805-808.
117. Ling K. K., Lin M. Y., Zingg B., Feng Z. and Ko C. P. Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. // *PLoS One*. - 2010. - V. 5. - № 11. - e15457.
118. Liu H., Lu J., Chen H., Du Z., Li X. J. and Zhang S. C. Spinal muscular atrophy patient-derived motor neurons exhibit hyperexcitability. // *Sci Rep*. - 2015. - V. 5. - 12189.
119. Liu Q. and Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. // *EMBO J*. - 1996. - V. 15. - № 14. - P. 3555-3565.
120. Loh Y. H., Wu Q., Chew J. L., Vega V. B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K. Y., Sung K. W., Lee C. W., Zhao X. D., Chiu K. P., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wei C. L., et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. // *Nat Genet*. - 2006. - V. 38. - № 4. - P. 431-440.

121. Loring J. F., Porter J. G., Seilhammer J., Kaser M. R. and Wesselschmidt R. A gene expression profile of embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived neurons. // *Restor Neurol Neurosci.* - 2001. - V. 18. - № 2-3. - P. 81-88.
122. Loring J. F., Schwartz P.H, Wesselschmidt R.L. *Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide.* - Amsterdam, 2007. - 461 p.
123. Lunn J. S., Sakowski S. A., Federici T., Glass J. D., Boulis N. M. and Feldman E. L. Stem cell technology for the study and treatment of motor neuron diseases. // *Regen Med.* - 2011. - V. 6. - № 2. - P. 201-213.
124. Lyssiotis C. A., Foreman R. K., Staerk J., Garcia M., Mathur D., Markoulaki S., Hanna J., Lairson L. L., Charette B. D., Bouchez L. C., Bollong M., Kunick C., Brinker A., Cho C. Y., Schultz P. G. and Jaenisch R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - V. 106. - № 22. - P. 8912-8917.
125. Magrane J., Cortez C., Gan W. B. and Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. // *Hum Mol Genet.* - 2014. - V. 23. - № 6. - P. 1413-1424.
126. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C. and Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell.* - 2008. - V. 3. - № 3. - P. 340-345.
127. Marini M., Sasongko T. H., Watihayati M. S., Atif A. B., Hayati F., Gunadi, Zabidi-Hussin Z. A., Ravichandran M., Nishio H. and Zilfalil B. A. Allele-specific PCR for a cost-effective & time-efficient diagnostic screening of spinal muscular atrophy. // *Indian J Med Res.* - 2012. - V. 135. - №. - P. 31-35.
128. 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. - V. 78. - № 12. - P. 7634-7638.
129. Martin G. R. and Evans M. J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1975. - V. 72. - № 4. - P. 1441-1445.

130. Martinez T. L., Kong L., Wang X., Osborne M. A., Crowder M. E., Van Meerbeke J. P., Xu X., Davis C., Wooley J., Goldhamer D. J., Lutz C. M., Rich M. M. and Sumner C. J. Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. // *J Neurosci.* - 2012. - V. 32. - № 25. - P. 8703-8715.
131. Martins-Taylor K. and Xu R. H. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells.* - 2012. - V. 30. - № 1. - P. 22-27.
132. Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N., Biancotti J. C., Yakir B., Clark A. T., Plath K., Lowry W. E. and Benvenisty N. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell.* - 2010. - V. 7. - № 4. - P. 521-531.
133. McAndrew P. E., Parsons D. W., Simard L. R., Rochette C., Ray P. N., Mendell J. R., Prior T. W. and Burghes A. H. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. // *Am J Hum Genet.* - 1997. - V. 60. - № 6. - P. 1411-1422.
134. McWhorter M. L., Monani U. R., Burghes A. H. and Beattie C. E. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. // *J Cell Biol.* - 2003. - V. 162. - № 5. - P. 919-931.
135. Meister G., Buhler D., Pillai R., Lottspeich F. and Fischer U. A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. // *Nat Cell Biol.* - 2001. - V. 3. - № 11. - P. 945-949.
136. Melki J., Abdelhak S., Sheth P., Bachelot M. F., Burlet P., Marcadet A., Aicardi J., Barois A., Carriere J. P., Fardeau M. and et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. // *Nature.* - 1990. - V. 344. - № 6268. - P. 767-768.
137. Mentis G. Z., Blivis D., Liu W., Drobac E., Crowder M. E., Kong L., Alvarez F. J., Sumner C. J. and O'Donovan M. J. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. // *Neuron.* - 2011. - V. 69. - № 3. - P. 453-467.

138. Merkl C., Saalfrank A., Riesen N., Kuhn R., Pertek A., Eser S., Hardt M. S., Kind A., Saur D., Wurst W., Iglesias A. and Schnieke A. Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. // *PLoS One*. - 2013. - V. 8. - № 1. - e55170.
139. Miguel-Aliaga I., Culetto E., Walker D. S., Baylis H. A., Sattelle D. B. and Davies K. E. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. // *Hum Mol Genet*. - 1999. - V. 8. - № 12. - P. 2133-2143.
140. Minoguchi S. and Iba H. Instability of retroviral DNA methylation in embryonic stem cells. // *Stem Cells*. - 2008. - V. 26. - № 5. - P. 1166-1173.
141. Monani U. R., Lorson C. L., Parsons D. W., Prior T. W., Androphy E. J., Burghes A. H. and McPherson J. D. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. // *Hum Mol Genet*. - 1999. - V. 8. - № 7. - P. 1177-1183.
142. Monani U. R., Sendtner M., Coover D. D., Parsons D. W., Andreassi C., Le T. T., Jablonka S., Schrank B., Rossoll W., Prior T. W., Morris G. E. and Burghes A. H. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. // *Hum Mol Genet*. - 2000. - V. 9. - № 3. - P. 333-339.
143. Morrison K. E. Advances in SMA research: review of gene deletions. // *Neuromuscul Disord*. - 1996. - V. 6. - № 6. - P. 397-408.
144. Moutou C., Gardes N., Rongieres C., Ohl J., Bettahar-Lebugle K., Wittemer C., Gerlinger P. and Viville S. Allele-specific amplification for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy. // *Prenat Diagn*. - 2001. - V. 21. - № 6. - P. 498-503.
145. Muller F. J., Goldmann J., Loser P. and Loring J. F. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 6. - № 5. - P. 412-414.

146. Munsat T. L. and Davies K. E. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). // *Neuromuscul Disord.* - 1992. - V. 2. - № 5-6. - P. 423-428.
147. Murray L. M., Beauvais A., Bhanot K. and Kothary R. Defects in neuromuscular junction remodelling in the *Smn(2B/-)* mouse model of spinal muscular atrophy. // *Neurobiol Dis.* - 2012. - V. 49C. - №. - P. 57-67.
148. Nanbo A., Sugden A. and Sugden B. The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. // *EMBO J.* - 2007. - V. 26. - № 19. - P. 4252-4262.
149. Niida H., Shinkai Y., Hande M. P., Matsumoto T., Takehara S., Tachibana M., Oshimura M., Lansdorp P. M. and Furuichi Y. Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA. // *Mol Cell Biol.* - 2000. - V. 20. - № 11. - P. 4115-4127.
150. Novitsch B. G., Chen A. I. and Jessell T. M. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor *Olig2*. // *Neuron.* - 2001. - V. 31. - № 5. - P. 773-789.
151. Ohuchi K., Funato M., Kato Z., Seki J., Kawase C., Tamai Y., Ono Y., Nagahara Y., Noda Y., Kameyama T., Ando S., Tsuruma K., Shimazawa M., Hara H. and Kaneko H. Established Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy Is Applicable in the Evaluation of the Efficacy of Thyrotropin-Releasing Hormone Analog. // *Stem Cells Transl Med.* - 2016. - V. 5. - № 2. - P. 152-163.
152. Okita K., Ichisaka T. and Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. // *Nature.* - 2007. - V. 448. - № 7151. - P. 313-317.
153. Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., Nakagawa M., Tanabe K., Tezuka K., Shibata T., Kunisada T., Takahashi M., Takahashi J., Saji H. and Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. // *Nat Methods.* - 2011. - V. 8. - № 5. - P. 409-412.

154. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T. and Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. // *Science*. - 2008. - V. 322. - № 5903. - P. 949-953.
155. Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N. and Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. // *Stem Cells*. - 2013. - V. 31. - № 3. - P. 458-466.
156. Oprea G. E., Krober S., McWhorter M. L., Rossoll W., Muller S., Krawczak M., Bassell G. J., Beattie C. E. and Wirth B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. // *Science*. - 2008. - V. 320. - № 5875. - P. 524-527.
157. Parsons D. W., McAndrew P. E., Monani U. R., Mendell J. R., Burghes A. H. and Prior T. W. An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. // *Hum Mol Genet*. - 1996. - V. 5. - № 11. - P. 1727-1732.
158. Passon N., Dubsky de Wittenau G., Jurman I., Radovic S., Bregant E., Molinis C., Damante G. and Lonigro I. R. Quick MLPA test for quantification of SMN1 and SMN2 copy numbers. // *Mol Cell Probes*. - 2010. - V. 24. - № 5. - P. 310-314.
159. Paushkin S., Gubitza A. K., Massenet S. and Dreyfuss G. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. // *Curr Opin Cell Biol*. - 2002. - V. 14. - № 3. - P. 305-312.
160. Peljto M., Dasen J. S., Mazzoni E. O., Jessell T. M. and Wichterle H. Functional diversity of ESC-derived motor neuron subtypes revealed through intraspinal transplantation. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 7. - № 3. - P. 355-366.
161. Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. // *EMBO Rep*. - 2007. - V. 8. - № 4. - P. 340-345.

162. Pellizzoni L., Baccon J., Rappsilber J., Mann M. and Dreyfuss G. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277. - № 9. - P. 7540-7545.
163. Pellizzoni L., Kataoka N., Charroux B. and Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. // *Cell.* - 1998. - V. 95. - № 5. - P. 615-624.
164. Pellizzoni L., Yong J. and Dreyfuss G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. // *Science.* - 2002. - V. 298. - № 5599. - P. 1775-1779.
165. Polo J. M., Anderssen E., Walsh R. M., Schwarz B. A., Nefzger C. M., Lim S. M., Borkent M., Apostolou E., Alaei S., Cloutier J., Bar-Nur O., Cheloufi S., Stadtfeld M., Figueroa M. E., Robinton D., Natesan S., Melnick A., Zhu J., Ramaswamy S. and Hochedlinger K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. // *Cell.* - 2012. - V. 151. - № 7. - P. 1617-1632.
166. Prior T. W., Snyder P. J., Rink B. D., Pearl D. K., Pyatt R. E., Mihai D. C., Conlan T., Schmalz B., Montgomery L., Ziegler K., Noonan C., Hashimoto S. and Garner S. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. // *Am J Med Genet A.* - 2010. - V. 152A. - № 7. - P. 1608-1616.
167. Puls I., Jonnakuty C., LaMonte B. H., Holzbaur E. L., Tokito M., Mann E., Floeter M. K., Bidus K., Drayna D., Oh S. J., Brown R. H., Jr., Ludlow C. L. and Fischbeck K. H. Mutant dynactin in motor neuron disease. // *Nat Genet.* - 2003. - V. 33. - № 4. - P. 455-456.
168. Qu Q., Li D., Louis K. R., Li X., Yang H., Sun Q., Crandall S. R., Tsang S., Zhou J., Cox C. L., Cheng J. and Wang F. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. // *Nat Commun.* - 2014. - V. 5. - №. - P. 3449.
169. Rajendra T. K., Gonsalvez G. B., Walker M. P., Shpargel K. B., Salz H. K. and Matera A. G. A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. // *J Cell Biol.* - 2007. - V. 176. - № 6. - P. 831-841.

170. Ravard-Goulvestre C., Boucly C., Mathieu B., Van Amerongen G., Viollet L., Estournet B., Barois A. and de Mazancourt P. Allele-specific amplification for the diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. // *Clin Chem Lab Med.* - 1999. - V. 37. - № 2. - P. 133-135.
171. Reinhardt P., Glatza M., Hemmer K., Tsytsyura Y., Thiel C. S., Hoing S., Moritz S., Parga J. A., Wagner L., Bruder J. M., Wu G., Schmid B., Ropke A., Klingauf J., Schwamborn J. C., Gasser T., Scholer H. R. and Sternecker J. Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. // *PLoS One.* - 2013. - V. 8. - № 3. - e59252.
172. Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., Kroning A. K., Karle K., Monani U. R. and Sendtner M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. // *J Cell Biol.* - 2003. - V. 163. - № 4. - P. 801-812.
173. Roy N., Mahadevan M. S., McLean M., Shutler G., Yaraghi Z., Farahani R., Baird S., Besner-Johnston A., Lefebvre C., Kang X. and et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. // *Cell.* - 1995. - V. 80. - № 1. - P. 167-178.
174. Rudnik-Schoneborn S., Berg C., Zerres K., Betzler C., Grimm T., Eggermann T., Eggermann K., Wirth R., Wirth B. and Heller R. Genotype-phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy (SMA) type I in Germany: implications for clinical trials and genetic counselling. // *Clin Genet.* - 2009. - V. 76. - № 2. - P. 168-178.
175. Sareen D., Ebert A. D., Heins B. M., McGivern J. V., Ornelas L. and Svendsen C. N. Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. // *PLoS One.* - 2012. - V. 7. - № 6. - e39113.
176. Sareen D., O'Rourke J. G., Meera P., Muhammad A. K., Grant S., Simpkinson M., Bell S., Carmona S., Ornelas L., Sahabian A., Gendron T., Petrucelli L., Baughn M., Ravits J., Harms M. B., Rigo F., Bennett C. F., Otis T. S., Svendsen C.

N. and Baloh R. H. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. // *Sci Transl Med.* - 2013. - V. 5. - № 208. - 208ra149.

177. Schmutz J., Martin J., Terry A., Couronne O., Grimwood J., Lowry S., Gordon L. A., Scott D., Xie G., Huang W., Hellsten U., Tran-Gyamfi M., She X., Prabhakar S., Aerts A., Altherr M., Bajorek E., Black S., Branscomb E., Caoile C., et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. // *Nature.* - 2004. - V. 431. - № 7006. - P. 268-274.

178. Schneuwly S., Klemenz R. and Gehring W. J. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. // *Nature.* - 1987. - V. 325. - № 6107. - P. 816-818.

179. Schrank B., Gotz R., Gunnensen J. M., Ure J. M., Toyka K. V., Smith A. G. and Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1997. - V. 94. - № 18. - P. 9920-9925.

180. Schuster J., Halvardson J., Pilar Lorenzo L., Ameer A., Sobol M., Raykova D., Anneren G., Feuk L. and Dahl N. Transcriptome Profiling Reveals Degree of Variability in Induced Pluripotent Stem Cell Lines: Impact for Human Disease Modeling. // *Cell Reprogram.* - 2015. - V. 17. - № 5. - P. 327-337.

181. Schwab A. J. and Ebert A. D. Sensory neurons do not induce motor neuron loss in a human stem cell model of spinal muscular atrophy. // *PLoS One.* - 2014. - V. 9. - № 7. - e103112.

182. Shi Y., Desponts C., Do J. T., Hahm H. S., Scholer H. R. and Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. // *Cell Stem Cell.* - 2008. - V. 3. - № 5. - P. 568-574.

183. Siminovitch L. M., E.A.; Till, J.E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. // *J. Cell. Comp. Physiol.* - 1963. - V. 62. - №. - P. 327-336.

184. Simsek M., Al-Bulushi T., Shanmugakonar M., Al-Barwani H. S. and Bayoumi R. Allele-specific amplification of exon 7 in the survival motor neuron (SMN) genes for molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. // *Genet Test.* - 2003. - V. 7. - № 4. - P. 325-327.
185. Sleigh J. N., Buckingham S. D., Esmaeili B., Viswanathan M., Cuppen E., Westlund B. M. and Sattelle D. B. A novel *Caenorhabditis elegans* allele, *smn-1(cb131)*, mimicking a mild form of spinal muscular atrophy, provides a convenient drug screening platform highlighting new and pre-approved compounds. // *Hum Mol Genet.* - 2011. - V. 20. - № 2. - P. 245-260.
186. Smith J. R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W. A. and Pedersen R. A. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. // *Dev Biol.* - 2008. - V. 313. - № 1. - P. 107-117.
187. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G. W., Cook E. G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isacson O. and Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. // *Cell.* - 2009. - V. 136. - № 5. - P. 964-977.
188. Sommer C. A., Sommer A. G., Longmire T. A., Christodoulou C., Thomas D. D., Gostissa M., Alt F. W., Murphy G. J., Kotton D. N. and Mostoslavsky G. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. // *Stem Cells.* - 2010. - V. 28. - № 1. - P. 64-74.
189. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G. and Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. // *Science.* - 2008. - V. 322. - № 5903. - P. 945-949.
190. Stevens L. C. Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1964. - V. 52. - №. - P. 654-661.
191. Stevens L. C. and Little C. C. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1954. - V. 40. - № 11. - P. 1080-1087.

192. Streit A., Berliner A. J., Papanayotou C., Sirulnik A. and Stern C. D. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. // *Nature*. - 2000. - V. 406. - № 6791. - P. 74-78.
193. Sumner C. J. Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. // *J Child Neurol*. - 2007. - V. 22. - № 8. - P. 979-989.
194. Taapken S. M., Nisler B. S., Newton M. A., Sampsell-Barron T. L., Leonhard K. A., McIntire E. M. and Montgomery K. D. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. // *Nat Biotechnol*. - 2011. - V. 29. - № 4. - P. 313-314.
195. Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell*. - 2006. - V. 126. - № 4. - P. 663-676.
196. Takazawa T., Croft G. F., Amoroso M. W., Studer L., Wichterle H. and Macdermott A. B. Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells. // *PLoS One*. - 2012. - V. 7. - № 7. - e40154.
197. Tamashiro K. L., Wakayama T., Akutsu H., Yamazaki Y., Lachey J. L., Wortman M. D., Seeley R. J., D'Alessio D. A., Woods S. C., Yanagimachi R. and Sakai R. R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. // *Nat Med*. - 2002. - V. 8. - № 3. - P. 262-267.
198. Thomas N. H. and Dubowitz V. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. // *Neuromuscul Disord*. - 1994. - V. 4. - № 5-6. - P. 497-502.
199. Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. and Jones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. // *Science*. - 1998. - V. 282. - № 5391. - P. 1145-1147.
200. Ulloa-Montoya F., Verfaillie C. M. and Hu W. S. Culture systems for pluripotent stem cells. // *J Biosci Bioeng*. - 2005. - V. 100. - № 1. - P. 12-27.
201. Ungrin M. D., Joshi C., Nica A., Bauwens C. and Zandstra P. W. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. // *PLoS One*. - 2008. - V. 3. - № 2. - e1565.

202. Valetdinova K. R., Medvedev S. P. and Zakian S. M. Model systems of motor neuron diseases as a platform for studying pathogenic mechanisms and searching for therapeutic agents. // *Acta Naturae*. - 2015. - V. 7. - № 1. - P. 19-36.
203. van der Steege G., Grootsholten P. M., van der Vlies P., Draaijers T. G., Osinga J., Cobben J. M., Scheffer H. and Buys C. H. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. // *Lancet*. - 1995. - V. 345. - № 8955. - P. 985-986.
204. Veronesi M. C., Yard M., Jackson J., Lahiri D. K. and Kubek M. J. An analog of thyrotropin-releasing hormone (TRH) is neuroprotective against glutamate-induced toxicity in fetal rat hippocampal neurons in vitro. // *Brain Res*. - 2007. - V. 1128. - № 1. - P. 79-85.
205. Vezain M., Saugier-veber P., Goïna E., Touraine R., Manel V., Toutain A., Fehrenbach S., Frebourg T., Pagani F., Tosi M. and Martins A. A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon 7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy. // *Hum Mutat*. - 2010. - V. 31. - № 1. - P. 1110-1125.
206. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Sudhof T. C. and Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. // *Nature*. - 2010. - V. 463. - № 7284. - P. 1035-1041.
207. Vitte J. M., Davoult B., Roblot N., Mayer M., Joshi V., Courageot S., Tronche F., Vadrot J., Moreau M. H., Kemeny F. and Melki J. Deletion of murine *Smn* exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. // *Am J Pathol*. - 2004. - V. 165. - № 5. - P. 1731-1741.
208. Voigt T., Meyer K., Baum O. and Schumperli D. Ultrastructural changes in diaphragm neuromuscular junctions in a severe mouse model for Spinal Muscular Atrophy and their prevention by bifunctional U7 snRNA correcting SMN2 splicing. // *Neuromuscul Disord*. - 2010. - V. 20. - № 11. - P. 744-752.
209. Wada T., Honda M., Minami I., Tooi N., Amagai Y., Nakatsuji N. and Aiba K. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived

- from human and monkey embryonic stem cells. // *PLoS One*. - 2009. - V. 4. - № 8. - e6722.
210. Wainger B. J., Kiskinis E., Mellin C., Wiskow O., Han S. S., Sandoe J., Perez N. P., Williams L. A., Lee S., Boulting G., Berry J. D., Brown R. H., Jr., Cudkowicz M. E., Bean B. P., Eggan K. and Woolf C. J. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. // *Cell Rep*. - 2014. - V. 7. - № 1. - P. 1-11.
211. Wang F., Yin Y., Ye X., Liu K., Zhu H., Wang L., Chiourea M., Okuka M., Ji G., Dan J., Zuo B., Li M., Zhang Q., Liu N., Chen L., Pan X., Gagos S., Keefe D. L. and Liu L. Molecular insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. // *Cell Res*. - 2012. - V. 22. - № 4. - P. 757-768.
212. Wang Z. B., Zhang X. and Li X. J. Recapitulation of spinal motor neuron-specific disease phenotypes in a human cell model of spinal muscular atrophy. // *Cell Res*. - 2013. - V. 23. - № 3. - P. 378-393.
213. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T., Loh Y. H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P. K., Smith Z. D., Meissner A., Daley G. Q., Brack A. S., Collins J. J., Cowan C., Schlaeger T. M. and Rossi D. J. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 7. - № 5. - P. 618-630.
214. Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K. and Sasai Y. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. // *Nat Neurosci*. - 2005. - V. 8. - № 3. - P. 288-296.
215. Wee C. D., Kong L. and Sumner C. J. The genetics of spinal muscular atrophies. // *Curr Opin Neurol*. - 2010. - V. 23. - № 5. - P. 450-458.
216. Wichterle H., Lieberam I., Porter J. A. and Jessell T. M. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. // *Cell*. - 2002. - V. 110. - № 3. - P. 385-397.

217. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J. and Campbell K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. // *Nature*. - 1997. - V. 385. - № 6619. - P. 810-813.
218. Woltjen K., Michael I. P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hamalainen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H. K. and Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. // *Nature*. - 2009. - V. 458. - № 7239. - P. 766-770.
219. Workman E., Saieva L., Carrel T. L., Crawford T. O., Liu D., Lutz C., Beattie C. E., Pellizzoni L. and Burghes A. H. A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice. // *Hum Mol Genet*. - 2009. - V. 18. - № 12. - P. 2215-2229.
220. Xie H., Ye M., Feng R. and Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. // *Cell*. - 2004. - V. 117. - № 5. - P. 663-676.
221. Xu C. C., Denton K. R., Wang Z. B., Zhang X. and Li X. J. Abnormal mitochondrial transport and morphology as early pathological changes in human models of spinal muscular atrophy. // *Dis Model Mech*. - 2016. - V. 9. - № 1. - P. 39-49.
222. Xu R., Ogino S., Lip V., Fang H. and Wu B. L. Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. // *Genet Test*. - 2003. - V. 7. - № 4. - P. 277-281.
223. Young P. J., Le T. T., thi Man N., Burghes A. H. and Morris G. E. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. // *Exp Cell Res*. - 2000. - V. 256. - № 2. - P. 365-374.
224. Yu J., Chau K. F., Vodyanik M. A., Jiang J. and Jiang Y. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. // *PLoS One*. - 2011. - V. 6. - № 3. - e17557.
225. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin, II and Thomson J. A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. // *Science*. - 2009. - V. 324. - № 5928. - P. 797-801.

226. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II and Thomson J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. // *Science*. - 2007. - V. 318. - № 5858. - P. 1917-1920.
227. Yusa K., Rad R., Takeda J. and Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. // *Nat Methods*. - 2009. - V. 6. - № 5. - P. 363-369.
228. Zeng H., Guo M., Martins-Taylor K., Wang X., Zhang Z., Park J. W., Zhan S., Kronenberg M. S., Lichtler A., Liu H. X., Chen F. P., Yue L., Li X. J. and Xu R. H. Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells. // *PLoS One*. - 2010. - V. 5. - № 7. - e11853.
229. Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. // *Nat Rev Genet*. - 2014. - V. 15. - № 12. - P. 814-827.
230. Zerres K., Rudnik-Schoneborn S., Forrest E., Lusakowska A., Borkowska J. and Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. // *J Neurol Sci*. - 1997. - V. 146. - № 1. - P. 67-72.
231. Zheleznyakova G. Y., Voisin S., Kiselev A. V., Sallman Almen M., Xavier M. J., Maretina M. A., Tishchenko L. I., Fredriksson R., Baranov V. S. and Schiöth H. B. Genome-wide analysis shows association of epigenetic changes in regulators of Rab and Rho GTPases with spinal muscular atrophy severity. // *Eur J Hum Genet*. - 2013. - V. 21. - № 9. - P. 988-993.
232. Zhou H., Wu S., Joo J. Y., Zhu S., Han D. W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Scholer H. R., Duan L. and Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. // *Cell Stem Cell*. - 2009. - V. 4. - № 5. - P. 381-384.
233. Zhou J., Su P., Li D., Tsang S., Duan E. and Wang F. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent

stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors. // *Stem Cells*. - 2010. - V. 28. - № 10. - P. 1741-1750.

234. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J. and Melton D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. // *Nature*. - 2008. - V. 455. - № 7213. - P. 627-632.

235. Zhou W. and Freed C. R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. // *Stem Cells*. - 2009. - V. 27. - № 11. - P. 2667-2674.

236. Zhu S., Li W., Zhou H., Wei W., Ambasudhan R., Lin T., Kim J., Zhang K. and Ding S. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. // *Cell Stem Cell*. - 2010. - V. 7. - № 6. - P. 651-655.

237. Григорьева Е. В., Валетдинова К.Р., Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Медведев С.П., Мазурок Н.И., Маретина М.А., Куранова М.Л., Киселев А.В., Баранов В.С., Закиян С.М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии // *Гены и клетки*. - 2016. - Т. XI. - № 2. - С. 70-81.

238. Кизилова Е. А. Оптимизация тератомного теста. // *Гены и клетки*. - 2016. - Т. XI. - № 2. - С. 119-128.

239. Скворцов Д. А., Зверева М. Э., Шпанченко О. В., Донцова О. А. Теломераза: методы определения активности // *Acta Naturae*. - 2011. - Т. 3. - № 1 (8). - С. 51-72.

ПРИЛОЖЕНИЕ

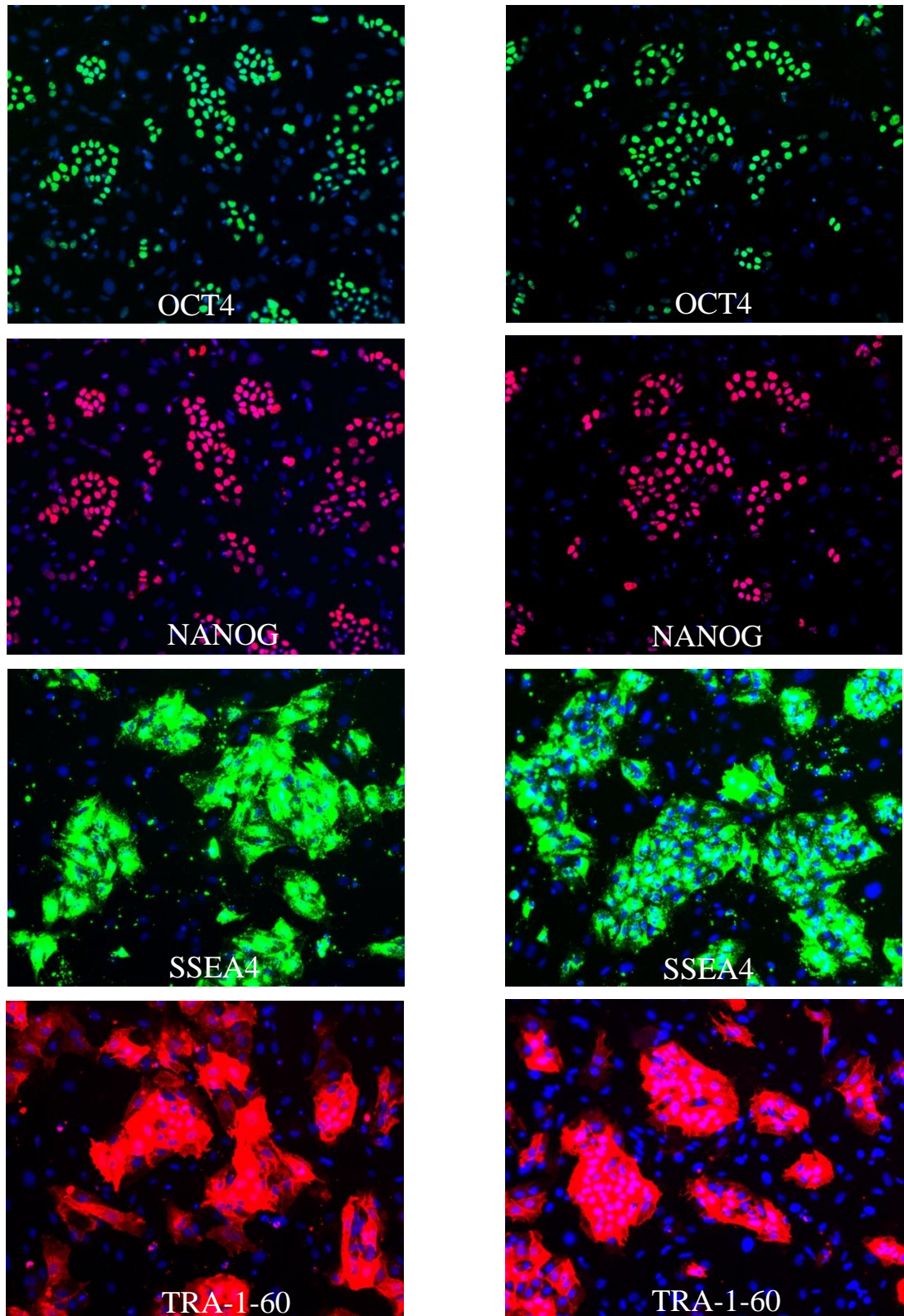


Рисунок 10. Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов OCT4, NANOG, а также поверхностным антигенам SSEA4 и TRA-1-60. Слева ИПСК линии m3SMA6 (от пациента со СМА II типа), справа – m34Sk3 (от здорового человека). Увеличение 10х. Синим цветом окрашены ядра (DAPI).

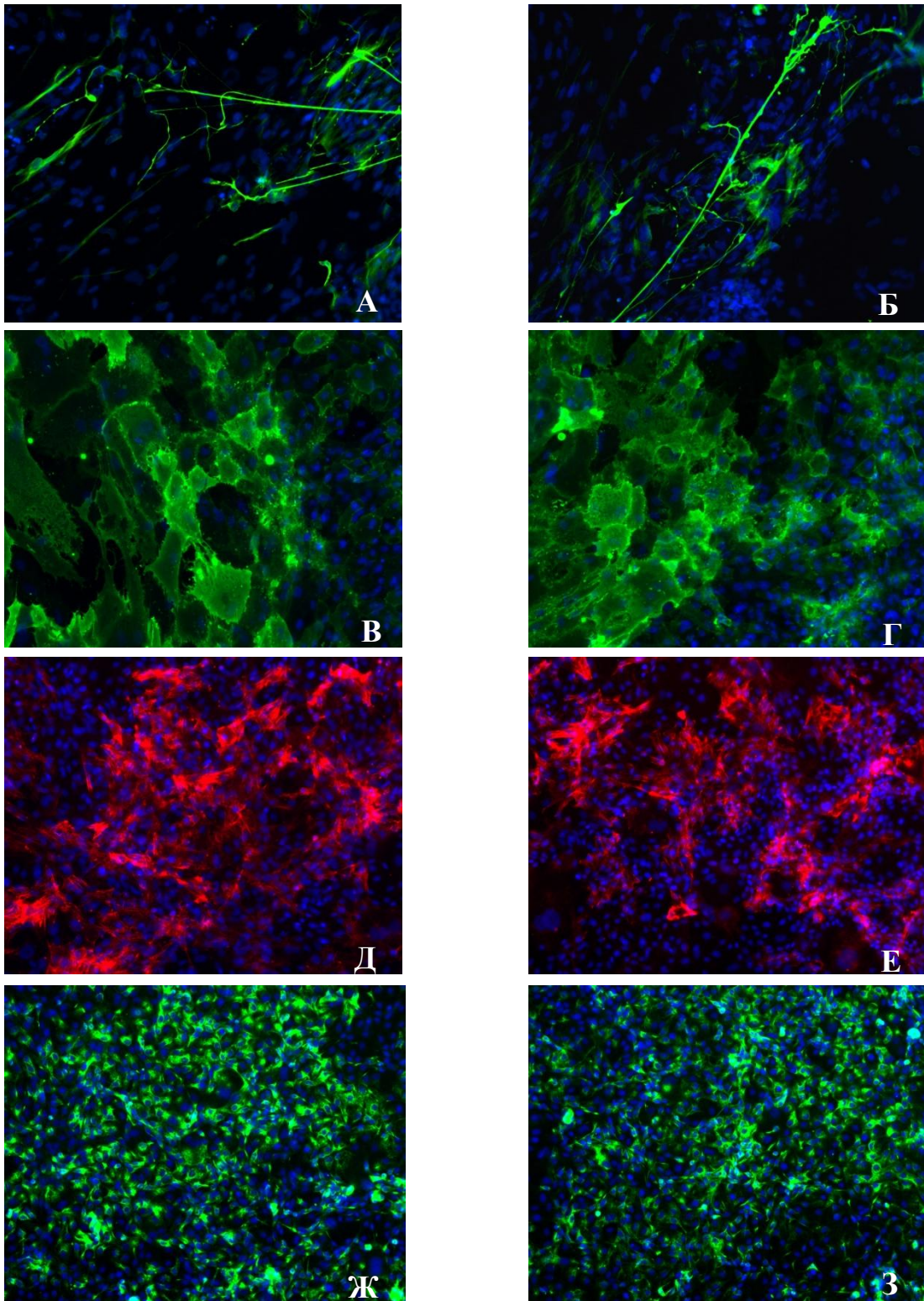


Рисунок 13. Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию производных трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке ИПСК в эмбрионных тельцах. Маркеры мезодермы – α SMA (Д,Е), CD90 (В,Г); эндодермы – CK18 (Ж,З); эктодермы – TUJ1 (А,Б). Слева ИПСК линии m3SMA6 (от пациента со СМА II типа), справа – m34Sk3 (от здорового человека). Увеличение 10х. Синим цветом окрашены ядра (DAPI).



Рисунок 15. Автономные опухоли, образовавшиеся после глубокой внутримышечной (А, Б) и подкожной (В, Г) инъекции ИПСК человека. Диаметр чашки 30 мм.

А, В. Разная локализация опухолей *in situ*.

Б, Г. Общий вид и морфология опухолей *in situ*.

Фотографии любезно предоставлены к.б.н., с.н.с. Кизиловой Е. А.

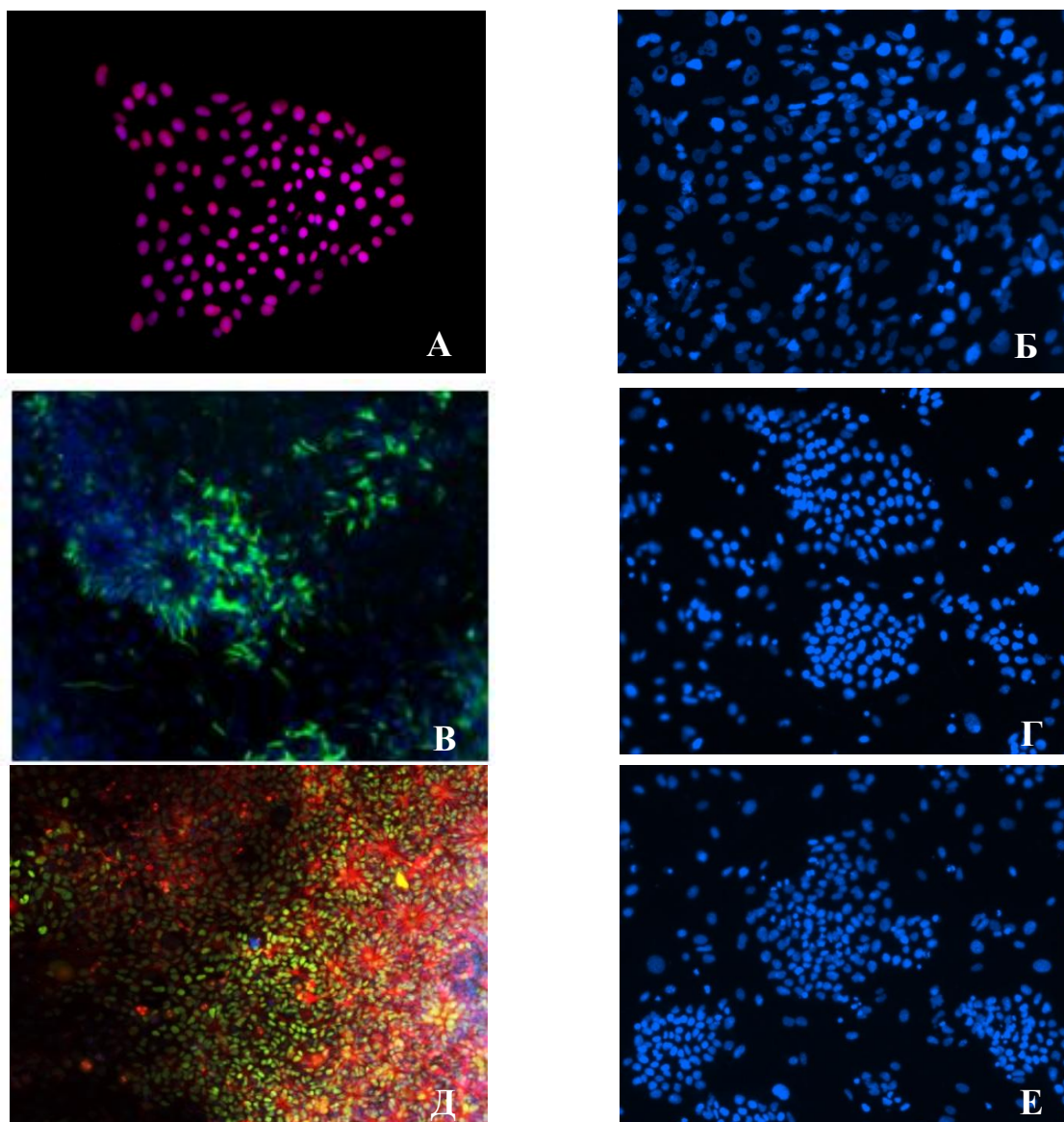


Рисунок 21. Контроли для иммунофлуоресцентного окрашивания. Синим цветом окрашены ядра клеток (DAPI). Увеличение 10х.

(А) Положительный контроль – ЭСК линии HUES9 на слое базальных белков Matrigel. Красный – NANOG.

(Б) Отрицательный контроль – спонтанная дифференцировка ИПСК линии m3SMA6. Красный – NANOG.

(В) Положительный контроль – спонтанная дифференцировка ЭСК человека линии HUES9. Зеленый – NF200.

(Г) Отрицательный контроль – линия ИПСК iSMA40. Зеленый – NF200.

(Д) Положительный контроль – нейральная дифференцировка ЭСК человека линии HUES9. Совмещение: PAX6 – зеленый, TUJ1 – красный. .

(Е) Отрицательный контроль – линия ИПСК iSMA40. Совмещение: PAX6 – зеленый, TUJ1 – красный.