

УДК 616.832.522:616.74-007.23:602.9

Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств

К. Р. Валетдинова^{1,2,3,4}, С. П. Медведев^{1,2,3,4}, С. М. Закиян^{1,2,3,4*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8³Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15⁴Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 10.10.2014

После доработки 19.01.2015

РЕФЕРАТ За последние 30 лет были открыты и изучены многие молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе болезней моторных нейронов (БМН). Среди этих болезней особое место занимают боковой амиотрофический склероз (БАС), при котором происходит прогрессирующая дегенерация и гибель центральных и периферических двигательных нейронов, и спинальная мышечная атрофия (СМА), одно из наследственных заболеваний, которое лидирует среди наследственных болезней в структуре детской смертности. Эти заболевания, как и большинство нервных, нейродегенеративных и психических болезней, не поддаются лечению на настоящий момент. Большое значение для поиска адекватных терапевтических средств, а также глубокого понимания патогенеза БМН имеют искусственные модельные системы, особенно основанные на использовании эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Данный обзор в основном посвящен последним достижениям в области создания и изучения клеточных и животных моделей БАС и СМА. Рассмотрены также основные проблемы, касающиеся использования клеточных технологий в биомедицинских целях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; моторные нейроны; спинальная мышечная атрофия; эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БМН – болезни моторных нейронов; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЛВД – лобно-височная деменция; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; СМА – спинальная мышечная атрофия; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЦНС – центральная нервная система.

ВВЕДЕНИЕ

В центральной нервной системе (ЦНС) тела моторных нейронов располагаются в двигательных зонах коры головного мозга (верхние или центральные мотонейроны), в ядрах черепно-мозговых нервов ствола головного мозга и в передних рогах серого вещества спинного мозга (нижние или периферические мотонейроны). Отростки этих нервных клеток (аксоны) в составе проводящих путей (пирамидные и экстрапирамидные пути), передних корешков спинного мозга и периферических нервов достигают скелетных мышц, где заканчиваются на иннервируемых

данными клетками мышечных волоконх нервно-мышечным синапсом.

Нейродегенеративные заболевания, при которых поражается преимущественно данная группа нервных клеток, называют болезнями моторных нейронов (БМН). Эти заболевания, как правило, характеризуются мышечной атрофией и параличом, приводящим к смерти пациентов [1]. При спинальной мышечной атрофии (СМА), прогрессирующей мышечной атрофии, спинально-бульбарной мышечной атрофии (болезни Кеннеди) и наследственных моторных невропатиях дегенеративные процессы затрагивают

нижние мотонейроны и их отростки [2]. При первичном латеральном склерозе, наследственной спастической параплегии, прогрессирующем бульбарном и псевдобульбарном параличе, спинальной мышечной атрофии с дыхательной недостаточностью типа I в основном поражаются верхние мотонейроны [2, 3]. А при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) в патологический процесс вовлечены как центральные, так и периферические двигательные нейроны [1].

Наибольший интерес представляют СМА, самое распространенное наследственное нейродегенеративное заболевание, особенно среди детей, и БАС – чрезвычайно гетерогенное заболевание, молекулярные механизмы которого исследованы недостаточно. Поскольку изучать патологические процессы, происходящие в клетках ЦНС при болезнях двигательных нейронов, неинвазивным и безопасным для пациента способом в настоящее время не представляется возможным, а постмортальное изучение тканей больных дает представление только о терминальных стадиях развития заболевания, то актуальной задачей становится получение адекватных модельных систем БАС и СМА. К решению этой проблемы можно подойти двумя путями.

Первый путь – создание животных моделей, в которых экспрессируются человеческие гены, вовлеченные в патогенез этих заболеваний. Однако такие модельные системы по понятным причинам не обладают всеми генотипическими и фенотипическими особенностями, характерными для БМН человека. Поэтому в настоящее время активно развивается второй путь, основанный на получении из плюрипотентных клеток человека моторных нейронов, вызывающих тот или иной фенотип БАС или СМА.

Плюрипотентными называют клетки, в результате дифференцировки которых образуются производные всех трех примитивных зародышевых листков – энто-, мезо- и эктодермы, это клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и эпибласта эмбрионов млекопитающих до [4] и после имплантации [5], а также эмбриональные герминативные клетки. Производные клеток ВКМ и эпибласта доимплантационных эмбрионов, культивируемые *in vitro* и длительно сохраняющие свойства своих предшественников, были названы эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Первые линии ЭСК человека получены еще в 1998 году [6].

В 2006 году группа японских ученых под руководством С. Яманака разработала способ репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние посредством экспрессии четырех факторов – Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4 [7]. Полученные клетки по своим характеристикам были близки

к ЭСК, поэтому были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК).

Моторные нейроны, полученные из ЭСК или ИПСК, представляют собой платформу не только для моделирования заболеваний, но и для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики терапии БМН и повреждений спинного мозга [8, 9]. Они могут использоваться в заместительной клеточной терапии поврежденных нервных клеток, а также в качестве компонентов микроокружения, вырабатывающих нейротрофические факторы и перерабатывающих токсические метаболиты. Терапевтический эффект трансплантации нейральных стволовых клеток, которые оказывают паракринное воздействие на ближайшее клеточное окружение, наблюдали при использовании нескольких моделей нейродегенеративных заболеваний [10, 11]. Для усиления данного эффекта можно искусственно модулировать продукцию конкретных нейротрофических факторов *in vitro*. В этом случае трансплантируемые клетки будут секретировать в поврежденную ткань необходимые для восстановления факторы, как, например, это показано на модели БАС у крыс (Gly93Ala), которым трансплантировали нейральные прогениторные клетки человека, экспрессирующие ГНТФ (глиальный нейротрофический фактор) [12].

В данном обзоре рассмотрены основные известные модельные системы БАС и СМА. Особое внимание уделено системам *in vitro*, а также вопросам применения клеточных технологий на практике.

БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ

Общая характеристика

Боковой амиотрофический склероз (БАС) (известный также как болезнь Лу Герига) впервые подробно описан в 1869 году выдающимся французским врачом, специалистом в области неврологических заболеваний Жаном-Мартеном Шарко. В самом названии отражены отличительные особенности этого заболевания: мышечная атрофия («амиотрофический»), обусловленная избирательным поражением периферических двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и двигательных ядер ствола мозга, а также корковых мотонейронов и боковых столбов спинного мозга («боковой склероз») [13]. Смерть пациентов, как правило, наступает в результате полного отказа дыхательной мускулатуры через 2–5 лет с момента появления первых симптомов [14].

БАС – орфанное заболевание, частота которого в разных популяциях составляет от одного–двух до четырех–шести случаев на 100000 человек в год [15–17]. В настоящее время в США зарегистрировано около 25000 больных БАС, средний возраст которых

составляет 55 лет. Кроме того, у мужчин БАС наблюдается чаще, чем у женщин (в соотношении 3 : 2) [18].

Выделяют sporadическую и семейную (или наследственную) форму БАС, причем на долю sporadической формы приходится порядка 90% всех случаев этого заболевания. Факторами риска БАС считаются воздействие тяжелых металлов, токсинов, например, естественного токсина цианобактерий β -N-метиламино-L-аланина, курение, тяжелые черепно-мозговые травмы, повышенная двигательная активность, латентные инфекции вирусной и невирусной природы, аутоиммунные реакции [19–26].

По современным представлениям наследственная форма БАС сцеплена с мутациями в 12 генах [1]. Всего же с развитием БАС ассоциированы мутации в 116 генах, представленные в постоянно обновляющейся базе данных ALSod (Amyotrophic lateral sclerosis Online Database – онлайн база данных БАС) [27]. В основном это однонуклеотидные замены в кодирующей части генов, делеции, инсерции, и экспансия повторенных последовательностей. К наиболее распространенным генетическим причинам БАС относятся экспансия гексануклеотидных повторов GGGGCC в первом интроне/промоторе гена *C9ORF72* [28–30], а также мутации в генах *SOD1* (*superoxide dismutase 1*, кодирует Cu/Zn-связывающую супероксиддисмутазу 1) [31], *TDP-43* (*TAR DNA-binding protein 43*, фактор транскрипции TAR, ДНК-связывающий белок) [32], *FUS* (*fused in sarcoma*, РНК-связывающий белок FUS) [33, 34], *ANG* (*angiogenin*, ангиогенин, рибонуклеаза) [35], *OPTN* (*optineurin*, оптинейрин) [36], *VCP* (*valosin containing protein*, валозинсодержащий белок) [37].

SOD1 экспрессируется во всех типах клеток, локализуется в цитоплазме, катализирует превращение супероксидного анион-радикала в свободный кислород и пероксид водорода. Мутации в гене *SOD1* наиболее многочисленны (свыше 160) [1], однако далеко не все из них приводят к формированию нефункционального белкового продукта, что объясняло бы решающую роль окислительного стресса и дисфункции митохондрий в патогенезе БАС. *TDP-43* и *FUS* – это мультифункциональные белки, участвующие в экспрессии генов и ее регуляции, включая транскрипцию, процессинг РНК, транспорт и трансляцию, а также синтез микроРНК. Цитоплазматические агрегаты *TDP-43* и *FUS* находят у больных ЛВД (лобно-височной деменцией) [38, 39]. Белковый продукт гена *ANG* также принимает участие в регуляции транскрипции. БАС-ассоциированные мутации *OPTN* активируют фактор транскрипции NF- κ B, а также влияют на распределение оптинейрина в цитоплазме. *VCP* участвует во множестве клеточных процессов, включая регуляцию клеточного цикла,

формирование ядерной оболочки, биогенез аппарата Гольджи, а также является одним из компонентов убиквитин-зависимой системы протеолиза [40].

При БАС страдают не только моторные, но и другие типы нейронов, а некоторые формы БАС сочетаются с ЛВД или с дегенерацией дофаминергических нейронов, расположенных в структурах среднего мозга, в составе базальных ганглиев (полосатое тело), лимбической системе (гиппокамп) и гипоталамусе. Даже у больных, в клинической картине которых доминируют дисфункции двигательной системы, обнаружены гистологические изменения в нескольких типах нейронов, включая клетки гиппокампа и базальных ганглиев [41].

Однако, несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не найдено методов эффективной терапии БАС, и лечение сводится фактически к купированию симптомов. Так, препарат рилузол, ингибитор высвобождения глутамата, обладая нейропротекторными свойствами, способен модулировать течение БАС, увеличивая продолжительность жизни больных на 2–3 месяца, но при этом ни в коей мере не ослабляя симптомов [42]. В США одобрено использование системы, стимулирующей диафрагму NeuRx DPS (Diaphragm Pacing System). Эта система позволяет на несколько месяцев продлить период времени, в течение которого больные БАС могут дышать самостоятельно без использования искусственной вентиляции легких.

Получение адекватных модельных систем БАС должно помочь в поиске эффективных лекарственных средств и ответа на вопрос, каким образом столь разнообразные молекулярные изменения приводят к избирательной гибели моторных нейронов.

Основные лабораторные модели БАС

Создание животных модельных систем БАС позволило расширить наше представление об этом заболевании и выявить ряд механизмов, приводящих к развитию БАС, включая дисфункцию митохондрий, мисфолдинг (неправильная упаковка) белков и образование белковых агрегатов, окислительный стресс, глутаматную эксайтотоксичность, не клеточные автономные эффекты, воспалительные процессы в нервной ткани, нарушение аксонального транспорта, нарушение процессинга РНК и др. (рис. 1).

Первые мыши, несущие мутации в гене *SOD1*, были получены еще в начале 90-х годов двадцатого века [31]. Мыши и крысы с разнообразными мутациями в этом гене являются наиболее детально изученной животной моделью БАС (табл. 1). Эти животные имеют летальный фенотип с поздней манифестацией, который характеризуется мышечной денервацией, активацией астроцитов и микроглии, потерей мотор-

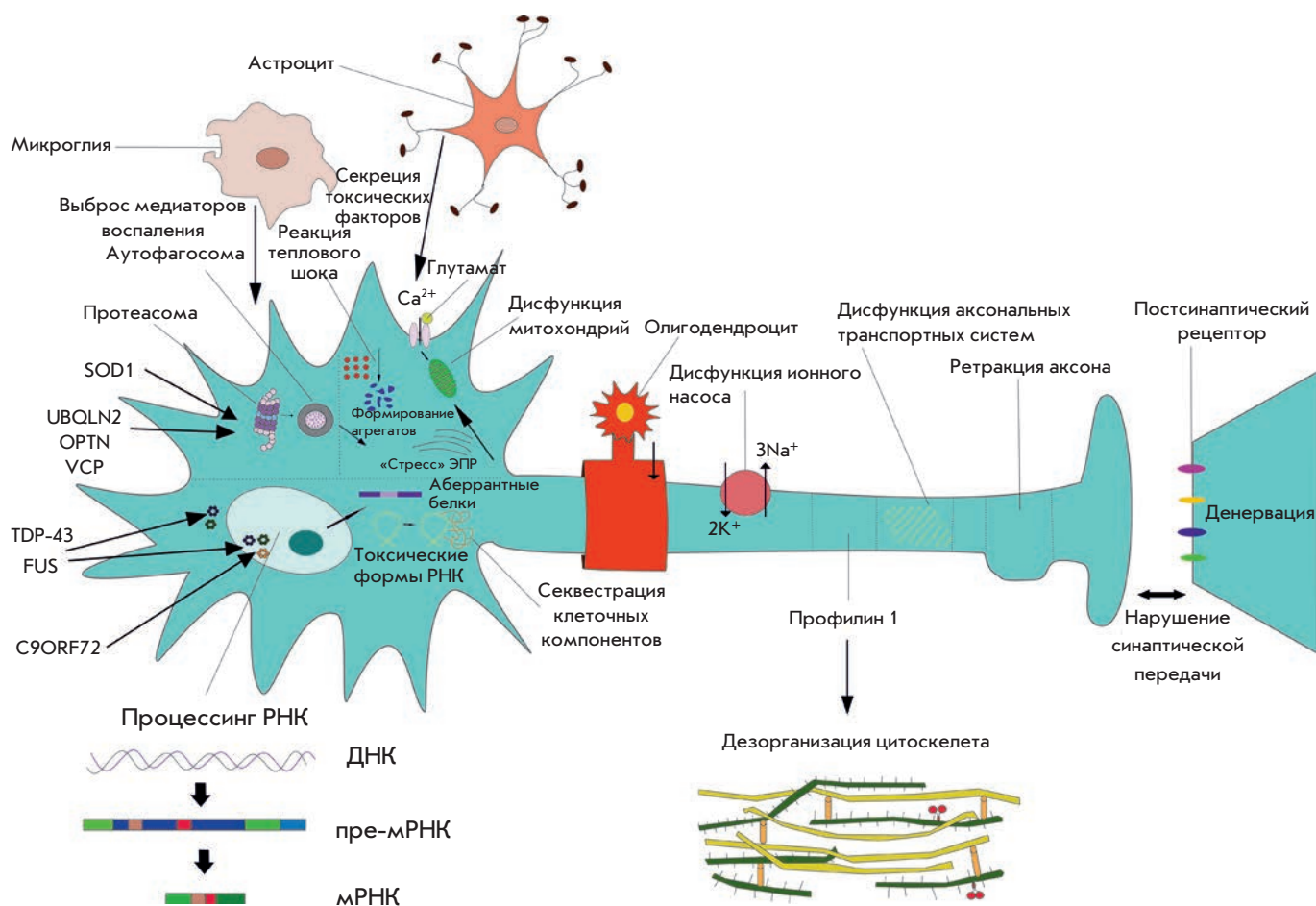


Рис. 1. Общая схема этиопатогенеза БАС. Мутации в генах *SOD1*, *VCP*, *UBQLN2*, *OPTN*, *CHMP2B* и, возможно, *TARDBP* вызывают изменения в системах деградации белков, нарушая нормальную протеасомную и аутофагосомную утилизацию. Мутации в генах *C9ORF72*, *TARDBP*, *FUS* нарушают процессинг РНК, в результате формируется большое количество aberrантных (неправильно собранных) белков и токсических форм РНК. Эти изменения приводят к внутриклеточной протеинопатии, характеризующейся образованием скоплений и гранул, стрессом эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, нарушением функционирования митохондрий. Дезорганизация цитоскелета аксонов и дисфункция систем аксонального транспорта приводят к денервации мотонейронов, расположенных ниже в цепи передачи сигнала (периферические мотонейроны), или мышечных волокон. Клетки, не относящиеся к нейронам, в том числе астроциты, микроглия, олигодендроциты, модифицируют этот процесс, так как не могут обеспечить нормальную жизнедеятельность нервных клеток и, кроме того, оказывают токсическое воздействие. Факторы, детерминирующие уровень чувствительности к повреждениям, в том числе факторы, модулирующие характер стрессового ответа (активация белков теплового шока) и обеспечивающие «предрасположенность» к эксайтотоксичности (особенности глутаматных рецепторов), определяют, какие именно нейроны в наибольшей степени будут подвержены данным процессам. Влияние таких белков, как профилин 1 и NFH (neurofilament heavy chain – белок тяжелой цепи нейрофиламентов), в данной модели проявляется на значительном удалении от тела нервной клетки. Они воздействуют напрямую на цитоскелет и оксидазу *D*-аминокислот, которая играет важную роль при эксайтотоксичности. Системы, участвующие в сигнальных процессах аксонального «наведения» (например, белки семейства семафоринов), а также в определении топографии связей в нервной системе (например, белки из семейства эфринов и ретикулонов), по-видимому, запускают процессы ретракции аксонов и денервации

ных нейронов в спинном мозге. Индуцировать такой фенотип можно, если обеспечить сверхэкспрессию мутантного белка *SOD1*, поэтому контролем в подобных экспериментах должны служить животные с повышенной экспрессией нормального белка.

Эффекты недостаточности *TDP-43* изучают на различных модельных организмах (табл. 1). У *Drosophila melanogaster* нокаут *TDP-43* приводит к появлению разнообразных нервно-мышечных дефектов [43], а у полосатого данио (*Danio rerio*) нока-

Таблица 1. Модели бокового амиотрофического склероза у животных

Модельный объект	Ген	Фенотип	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS</i>	Нарушение целостности митохондриальных мембран, образование агрегатов TDP-43 и FUS.	[155–158]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS, tdp-1</i>	Некоординированные движения и локомоторные дефекты, паралич, дегенерация моторных нейронов, нарушение синаптической передачи, аккумуляция в ядре агрегатов TDP-43, образование агрегатов SOD1.	[159–164]
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS</i>	Двигательные дефекты, стрессовая активация глиальных клеток, образование агрегатов SOD1, глиоз, аксональная дегенерация, атрофия нейронов. В целом эффекты варьируют в зависимости от того, в какой ткани экспрессируются нормальные/мутантные белки SOD1, TARDBP, FUS.	[165–173]
<i>Danio rerio</i>	<i>SOD1, TARDBP, FUS, Sod1</i>	Двигательные дефекты, мышечная атрофия, утрата моторных нейронов, сниженная выживаемость.	[174–176]
<i>Mus musculus</i> <i>Rattus norvegicus</i>	<i>TARDBP, SOD1, Sod1, Tardbp</i>	Фенотип БАС: тремор, прогрессирующие моторные нарушения и паралич, глиоз, убиквитинированные включения SOD1, дегенерация аксонов и моторных нейронов, вакуолизация митохондрий, редкие цитоплазматические агрегаты фосфорилированного TDP-43.	[48, 51, 177–192]
Собаки пород Pembroke Welsh corgi, Boxer, Rhodesian ridgeback, German Shepherd, Chesapeake Bay	<i>SOD1</i>	Дегенеративная миелопатия собак: в цитоплазме нейронов наблюдаются включения, связывающиеся с антителами к SOD1; демиелинизация белого вещества латеральных пучков и потеря аксонов.	[193, 194]
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>TDP-43</i>	Накопление в цитоплазме агрегатов TDP-43 и цистатин С-позитивных гранул; прогрессирующая моторная слабость дистальных отделов верхних конечностей, фасцикуляция и атрофия.	[52]

даун TDP-43 вызывает образование укороченных аксонов с неправильным ветвлением [44]. У мышей гомозиготная делеция гена *Tardbp*, который кодирует TDP-43, летальна, однако у гетерозиготных животных наблюдаются лишь умеренные моторные дефекты [45]. У дрожжей, нематоды и *D. rerio* сверхэкспрессия мутантного TDP-43 индуцирует более серьезные нарушения, чем сверхэкспрессия нормального белка [44–46]. Повышенная экспрессия нормального или мутантного белка TDP-43 у грызунов приводила к формированию фенотипа с кортикальными нарушениями с вовлечением в ряде случаев периферических моторных нейронов [47–51]. У яванского макака (*Macaca fascicularis*) сверхэкспрессия TDP-43 в спинном мозге индуцировала прогрессирующую гибель моторных нейронов [52].

Показано, что некоторые делеции в гене *Fus* у мышей летальны или индуцируют фенотип, не связанный с нейродегенерацией [53, 54]. У мышей с нокаутом *FUS* в нейронах гиппокампа снижено количество дендритов и выражены дефекты морфологии этих отростков [55]. Сверхэкспрессия нормального белка *FUS* человека у трансгенных мышей вызывала активную дегенерацию моторных нейронов, которая характеризуется образованием глобулярных и «подобных клубку пряжи» *FUS*-позитивных включений в двигательных нейронах [56]. У крыс сверхэкспрес-

сия *FUS* с мутацией Arg521Cys приводила к гибели кортикальных, гиппокампальных и моторных нейронов, а также к денервации и развитию параличей [57].

Таким образом, данные модели БАС показывают важную роль белков SOD1, TDP-43 и FUS в функционировании различных клеток нервной системы, в том числе моторных нейронов.

Клеточные модели БАС

К настоящему времени получены клеточные модели как наследственной, так и спорадической формы БАС (табл. 2). Однако технологии и подходы, в которых используются ИПСК пациентов, применяются в основном не для прямого поиска способов терапии, а для выявления и глубокого анализа механизмов патогенеза этого нейродегенеративного заболевания.

Клеточные модели наследственной формы БАС

SOD1. В моторных нейронах, содержащих ген *SOD1* с мутацией Asp90Ala, наблюдаются признаки агрегации нейрофиламентов, которая приводит к дегенерации нейритов [58]. Обнаружено, что мутантный белок *SOD1* способен связываться с 3'-нетранслируемой областью мРНК одного из компонентов нейрофиламентов – *NF-L*, понижая ее стабильность. Тем самым нарушается соотношение отдельных субъеди-

Таблица 2. Клеточные модели бокового атрофического склероза

Ген	Мутация	Фенотип	Ссылка
<i>TDP-43</i>	Met337Val Gln343Arg Gly298Ser	Снижение выживаемости, повышенная чувствительность к ингибированию киназы PI3K, повышенный уровень белка TDP-43.	[65, 68–70]
<i>SOD1</i>	Gly85Ser Leu144Phe Ala4Val Asp90Ala Asn87Ser Ser106Leu	Сверхвозбуждение мембран, агрегация нейрофиламентов, дисфункция митохондрий, окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума.	[58, 60, 146, 195, 196]
<i>FUS</i>	His517Gln	Сверхвозбуждение мембран, агрегаты FUS.	[60]
<i>C9ORF72</i>	Экспансия гексануклеотидного повтора GGGGCC в первом интроне/промоторе	Аномальные электрофизиологические показатели, сверхвозбуждение мембран, образование фокальных гранул РНК <i>C9ORF72</i> , содержащих белки hnRNP A1 и Pur-α.	[60, 71]
Спорадическая форма		Внутриядерные агрегаты гиперфосфорилированного белка TDP-43.	[75]

ниц нейрофиламентов в моторных нейронах. Именно это взаимодействие может запускать цепь событий, которая приводит к избирательной гибели моторных нейронов [58].

В моторных нейронах с миссенс-мутацией Ala4Val в гене *SOD1* обнаруживаются дефекты в системе митохондриального транспорта и изменения морфологии митохондрий. В них наблюдаются проявления окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума, а также активируются реакции несвернутых белков (ПНБ) [59]. Кроме того, анализ результатов высокопроизводительного секвенирования мРНК с помощью платформ DAVID и GSEA показал, что в мотонейронах с генотипом *SOD1*^{+/44V} транскрипция генов изменена по сравнению с изогенным контролем без этой мутации. В мотонейронах с мутацией *SOD1* повышен уровень транскрипции генов, кодирующих сократительные белки, в частности кинезины, а также генов, участвующих в формировании цитоскелета и регуляции транскрипции. При этом уровень транскрипции генов, вовлеченных в функционирование митохондрий и трансляцию, в этих клетках был существенно снижен [59].

Электрофизиологическое исследование моторных нейронов, полученных из ИПСК пациентов с мутациями в гене *SOD1*, а также в *C9ORF72* и *FUS*, выявило сверхвозбуждение их мембран, которое может быть основным элементом патогенеза БАС, приводящим к гибели мотонейронов [60]. В таких клетках отмечалось снижение амплитуды медленного-выпрямляющего калиевого тока, что может быть причиной сверхвозбуждения их мембран. Применение активатора калиевых каналов ретигабина блокировало сверхвозбуждение и повышало выживаемость моторных нейронов, несущих мутации в гене *SOD1* [60].

Проведенный на ЭСК мышей с мутациями *SOD1* скрининг выявил ряд возможных лекарственных средств [61]. Ранее была обнаружена связь между киназой-3-гликогенсинтазы (*GSK-3*, glycogen synthase kinase 3) и БАС [62]. Установлено, что ингибирование *GSK-3*-пути снижает апоптоз нейронов [63, 64]. Один из ингибиторов этого пути, кенпаулон, вызывал существенное увеличение жизнеспособности моторных нейронов мышцы с мутациями *SOD1*, а также повышал выживаемость мотонейронов, полученных после дифференцировки ИПСК больных БАС [61].

Кроме того, первичная культура клеток глии мышцы, экспрессирующая мутантный (Gly93Ala) белок *SOD1* человека, оказывает повышенное токсическое действие на моторные нейроны. Вероятнее всего, в случае мутаций в *SOD1* патогенез БАС происходит по неавтономному механизму [65, 66].

TDP-43. Известно, что в 97% случаев БАС и в 45% случаев ЛВД в моторных нейронах обнаруживаются агрегаты белка TDP-43 [67]. Установлено, что в моторных нейронах, полученных из ИПСК с миссенс-мутацией Met337Val в гене *TDP-43*, повышен уровень растворимого и устойчивого к детергентам белка TDP-43, снижена выживаемость при длительном культивировании, а также повышена чувствительность к ингибированию киназы PI3K [68].

Изучение астроцитов, полученных из мутантных ИПСК (Met337Val), показало, что в них, как и в моторных нейронах, повышен уровень белка TDP-43, агрегаты которого обнаруживаются преимущественно в цитоплазме клеток. Эти клетки обладают также сниженной выживаемостью в культуре [65]. Сокультивирование мутантных астроцитов с мутант-

ными и контрольными моторными нейронами показало, что присутствие астроцитов не влияет на жизнеспособность моторных нейронов. Это доказывает, что в случае мутаций в гене *TDP-43* патогенез БАС происходит по клеточно-автономному пути [65].

В моторных нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов, несущих мутации *TDP-43* Met337Val, Gln343Arg и Gly298Ser, повышено количество нерастворимой формы белка TDP-43, связанного с белком сплайсосом SNRPB2 [69]. Кроме того, в этих клетках повышен уровень транскрипции генов, вовлеченных в метаболизм РНК, и снижен уровень транскрипции генов, кодирующих белки цитоскелета. Были протестированы пять соединений – ингибиторов ферментов, участвующих в установлении ковалентных модификаций хроматина и белков, связанных со сплайсингом РНК: трихостатин А (ингибитор гистон-деацетилтрансфераз), сплайсостатин А (ингибитор белков сплайсосом), анакардиевая кислота и гарцинол (ингибиторы гистон-ацетилтрансфераз). Оказалось, что анакардиевая кислота способна повышать выживаемость мутантных моторных нейронов, снижать уровень транскрипции мРНК гена *TDP-43* и уровень белка TDP-43 в нерастворимой фракции, а также увеличивать длину нейритов моторных нейронов [69].

ИПСК могут использоваться не только для поиска новых соединений, потенциальных лекарственных средств от БАС, но и для изучения альтернативных способов терапии, например, с помощью РНК-интерференции. В результате дизайна малых интерферирующих РНК (миРНК), предназначенных для аллель-специфического подавления трансляции мутантного белка (Met337Val) TDP-43 [70], было показано, что применение миРНК позволяет снизить на 30% уровень цитоплазматического белка TDP-43 в нейральных стволовых клетках, полученных из ИПСК больного [70].

C9ORF72. РНК мутантного гена *C9ORF72* с аномальным числом гексануклеотидов GGGGCC в первом интроне/промоторе также может инициировать патологический процесс при БАС. В моторных нейронах, полученных после дифференцировки ИПСК от пациента с семейной формой С9-БАС (экспансия гексануклеотидных повторов в гене *C9ORF72*), отмечен повышенный уровень транскрипции *C9ORF72*, а также образование фокальных скоплений РНК *C9ORF72*, содержащих, помимо прочего, РНК-связывающие белки hnRNPA1 и Pur- α [71]. Известно, что hnRNPA1 связывается с молекулами TDP-43 [72], поэтому при удалении hnRNPA1 из фокальных скоплений изменяется, вероятно, взаимодействие TDP-43 со своими РНК-мишенями. Таким образом, между дву-

мя формами БАС (С9-БАС и опосредованный TDP-43 БАС) обнаруживается потенциальная взаимосвязь. Кроме того, обнаружено, что мутации в белках hnRNPA1 и hnRNPA2/B1 являются одной из причин БМН у человека [73]. Также показано, что Pur- α взаимодействует с фокальными скоплениями РНК, содержащими повторы GGGGCC, и модулирует токсическое действие подобных образований в модели БАС у *D. melanogaster* [74]. Клетки, экспрессирующие мутантную РНК гена *C9ORF72*, имеют измененный уровень экспрессии генов, связанных с возбудимостью мембран, в частности *DPP6*, и имеют аномальные электрофизиологические показатели. Применение антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных к РНК гена *C9ORF72*, позволяет подавлять формирование фокальных скоплений и восстанавливать нормальный уровень транскрипции генов в моторных нейронах [71]. Эти работы служат примером того, что дифференцированные производные ИПСК можно применять для поиска и изучения потенциальных лекарственных средств [61, 69].

Клеточные модели sporadic формы БАС

От пациентов со sporadic формой БАС Бурхард и соавт. [75] получили линии ИПСК, имеющие уникальный генетический и эпигенетический фон. В ядрах мотонейронов, дифференцированных из этих клеток, уже через 2 месяца культивирования наблюдалось образование гиперфосфорилированных агрегатов белка TDP-43 [75], однако скопления меченных убиквитином гранул TDP-43 обнаружены не были. Это позволило сделать вывод о том, что убиквитинированию TDP-43 подвергается на более поздних стадиях данной протеинопатии, чем гиперфосфорилированию. Авторы отмечают, что для изучения причин, приводящих к столь большому разнообразию sporadic случаев БАС, важно проводить дифференцировку ИПСК, полученных от разных пациентов, не только в моторные нейроны, но и в клетки других типов. Эта модель представляет особый интерес для поиска терапевтических агентов и факторов, модифицирующих БАС.

СПИНАЛЬНАЯ МЫШЕЧНАЯ АТРОФИЯ

Общая характеристика

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – нейродегенеративное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующееся дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, приводящей к мышечной атрофии, параличу и смерти пациента [76–78]. Впервые спинальная мышечная атрофия у детей была описана

Г. Вердником в 1891 году. Частота встречаемости этого заболевания в европейских популяциях равна 1 на 10000 новорожденных, при этом частота носительства мутантного гена равна 1 на 40–50 [79].

Более 95% больных СМА имеют гомозиготную делецию в гене *SMN1* (*Survival Motor Neuron1*), расположенном на хромосоме 5, в единичных случаях встречаются инверсии, мутации по типу сдвига рамки считывания, миссенс-, нонсенс-мутации и изменения сайтов сплайсинга [80, 81]. Полный список известных мутаций гена *SMN1* доступен в базе данных Leiden Open Variation Database (http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select_db=SMN). На этой же хромосоме расположен псевдоген *SMN2*, который отличается от *SMN1* всего лишь восемью однонуклеотидными заменами: по одной в седьмом и восьмом экзонах, остальные замены находятся в интронах [82]. Замена С на Т в седьмом экзоне приводит к изменению сплайсинга транскрипта *SMN2*, в результате чего 90% транслируемых РНК не содержат экзон 7, а белковый продукт получается укороченным и нестабильным [83, 84] (рис. 2). При этом число копий псевдогена в геноме разных индивидов может варьировать от 0 до 6. Чем больше копий *SMN2*, тем меньше тяжесть симптомов СМА [85–87]. Значимость гена *SMN2* для развития более легкой формы спинальной мышечной атрофии подтверждается бессимптомными случаями, когда у индивидов, гомозиготных по делеции гена *SMN1*, достаточно велико (четыре и более) число копий гена *SMN2* [88].

В зависимости от возраста манифестации, тяжести течения и продолжительности жизни различают следующие типы этого заболевания [89]:

Тип I (болезнь Вердникова–Гоффмана) – наиболее тяжелая форма, которая проявляется в течение первых 6 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 не превышает 2 лет.

Тип II – промежуточная форма, имеет более позднее начало, как правило, в возрасте 7–18 месяцев. Больные дети могут сидеть, но никогда не начинают ходить самостоятельно. Продолжительность жизни – более 2 лет.

Тип III (болезнь Кугельберга–Веландер) – легкая/умеренная форма. Первые симптомы появляются после 18 месяцев. Больные могут стоять и ходить.

Тип IV – взрослая форма. В большинстве случаев начинается после 20–30 лет, не влияет значительно на продолжительность жизни. Проявляется слабостью проксимальной мускулатуры, фасцикуляциями – непроизвольными, беспорядочными сокраще-

ниями отдельных групп мышечных волокон, а также снижением сухожильных рефлексов.

Белковый продукт гена *SMN1* выполняет в клетке несколько функций: участвует в сплайсинге пре-мРНК, транспортировке зрелых мРНК и росте аксонов [90–94]. *SMN* – центральный компонент сложного комплекса, необходимого для сборки сплайсосомных частиц мРНК (small nuclear ribonucleic particles, snRNP, – малые ядерные рибонуклеопротеиды) [95]. Известно, что в каждом цикле сплайсинга ассоциация между собой компонентов сплайсосом происходит каждый раз заново путем пошаговой сборки, из чего следует, что мутантный *SMN* не способен обеспечить эффективную сборку частиц мРНК. Поэтому одна из гипотез, объясняющих механизм СМА, основана на предположении о том, что нарушение формирования мРНК влияет на сплайсинг определенной группы генов, важных для функционирования цепи моторных нейронов [95–97].

В 2006 году была обнаружена аксональная изоформа белка (α -*SMN*), продукта гена *SMN1* [98]. Аксональный *SMN*-транскрипт 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 [98]. 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 [99]. Поэтому вторая гипотеза предполагает, что при СМА нарушается та важнейшая функция, которую выполняет *SMN* в аксонах моторных нейронов [91, 94–97, 99, 100]. Так почему же при мутациях *SMN1* избирательно гибнут именно двигательные нейроны? И как можно помочь больным СМА? Ответить на эти вопросы должны помочь искусственные модельные системы.

Основные животные модели СМА

Недостаток белка *SMN* изучается на нескольких модельных организмах (табл. 3). Однако работа с животными осложняется тем, что их геномы содержат только один ген *Smn*, эквивалентный гену *SMN1* человека, но у них нет псевдогена *SMN2*. Поэтому при нокауте *Smn* все животные погибают, а время

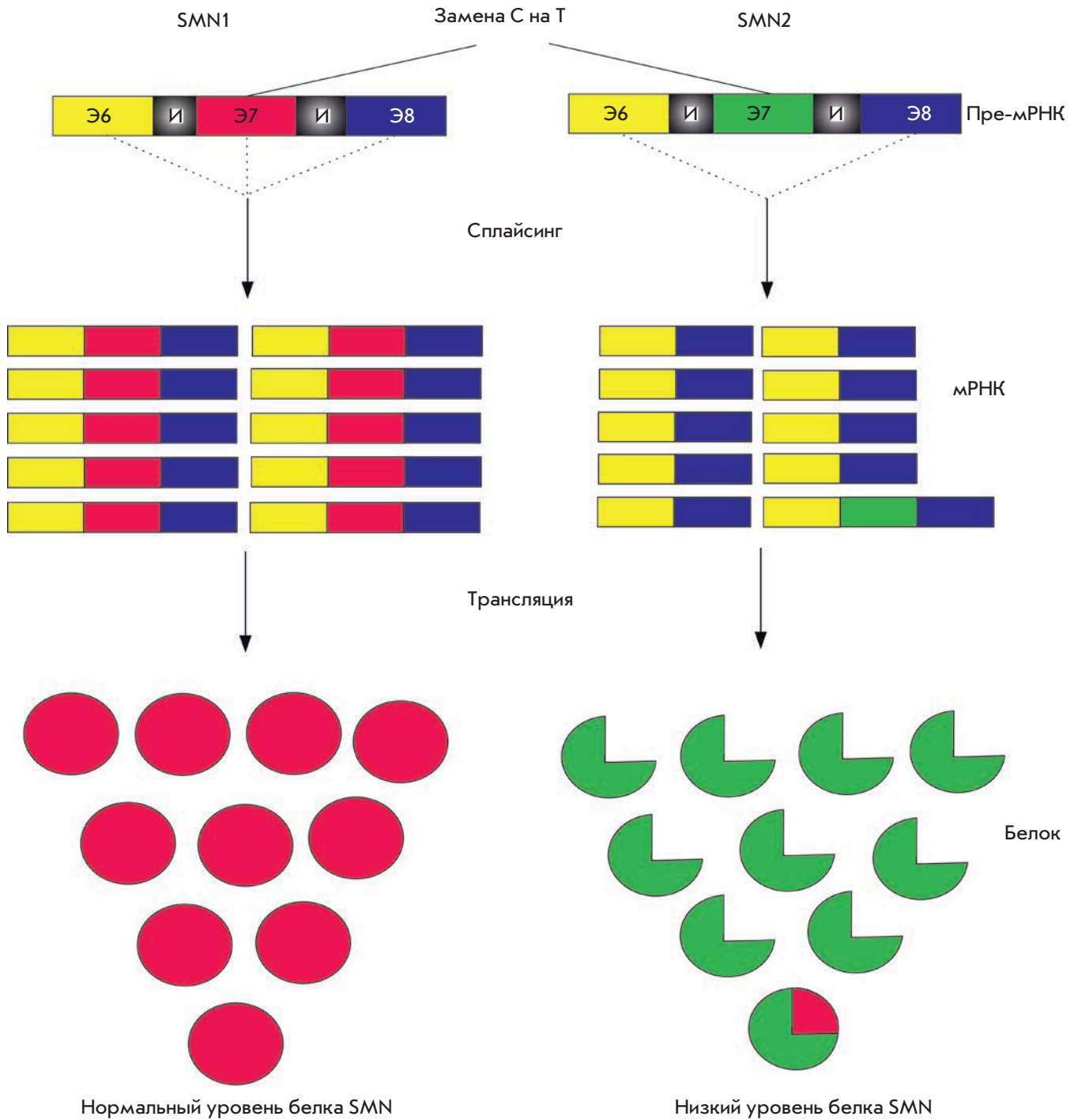


Рис. 2. Экспрессия генов *SMN1* и *SMN2* (описание в тексте)

гибели определяется уровнем мРНК этого гена, которая досталась новому организму от матери. Так, у мышей гибель происходит на ранних этапах развития [101], а у организмов, откладывающих яйца, например у *D. melanogaster*, смерть наступает позднее, когда уровень белка SMN, доставшегося от матери, снизится до критической точки [102]. Как и ожида-

лось, нокаут *Smn* в определенной ткани приводил к нарушению развития этой ткани и гибели большей части ее клеточного компонента [103–105]. Трансгенным мышам со СМА обычно внедряют в геном дополнительные копии *SMN2*. Две копии этого гена обеспечивают большую выживаемость эмбрионов, в то время как восемь копий приводят к появ-

Таблица 3. Модели спинальной мышечной атрофии у животных

Объект	Манипуляции с геном <i>SMN (Smn)</i>	Фенотип	Ссылка
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Нокаут	Гибель	[197–199]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Нокаут, нокадаун, точковые мутации	Гибель эмбрионов, дефекты развития, моторные дефекты, уменьшение продолжительности жизни.	[109, 200, 201]
<i>Drosophila melanogaster</i>	Точковые мутации, эквивалентные нулевым аллелям, мутации, приводящие к нарушению распределения <i>Smn</i> у взрослых мух, нокадаун	Гибель эмбрионов, потеря способности летать и прыгать.	[102, 112, 202]
<i>Danio rerio</i>	Нокадаун	Гибель, нарушение формирования аксонов.	[91]
<i>Mus musculus</i>	Нокаут, направленное изменение экспрессии в определенных 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 5 дней.	[101, 103–107, 203]

лению мышечной с нормальным фенотипом [106, 107]. Показано, что двух копий *SMN2* достаточно для нормального функционирования большинства тканей, однако моторным нейронам необходим более высокий уровень *SMN*, по крайней мере, у мыши [108].

Для проведения трудоемких 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. 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 [109]. 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 [110]. Эти данные находят подтверждение и у человека. Так, в ходе проведения полногеномного анализа метилирования были обнаружены значительные отличия в уровне метилирования ДНК двух генов *CHML* 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 [111].

Результаты, полученные на различных животных моделях СМА, следует интерпретировать с осторожностью. Например, у *D. melanogaster* можно добиться выживания *SMN*-дефицитных мух путем экспрессии этого белка в мышечной ткани [102, 112]. А у мышей со СМА экспрессия *SMN* в мышцах такого эффекта не дает [108]. Однако можно обратить внимание, что в этих экспериментах у *D. melanogaster* *SMN* экспрессировался в мезодермальных предшественниках мышечных волокон, а у мышей – в уже сформированных мышечных волокнах, которые более не делятся.

Клеточные модели СМА

В настоящее время получены ИПСК больных СМА типа I [113–115]. Эти клетки дифференцируются в моторные нейроны *in vitro* с той же изначальной эффективностью, как и контрольные клетки, не имеющие в геноме мутаций *SMN1* [113, 114]. Однако во время продолжительного культивирования число и размер моторных нейронов, полученных от больных СМА, существенно сокращается по сравнению с культурами моторных нейронов здоровых доноров [113]. 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 [114].

В нейронах и астроцитах белок *SMN* локализуется в цитоплазме, а в ядре нервных клеток он располага-

ется 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 [116]. Показано, что количество gems в ядре коррелирует с формой СМА [117]. У здоровых людей число gems соответствует числу телец Кахаля и они легко детектировались. У больных СМА типа I обнаружены только тельца Кахаля, тогда как gems отсутствовали, а при СМА типа III gems выявлены только в некоторых ядрах [118, 119]. 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 [113].

В работе Корти с соавт. ИПСК от больных СМА получали, используя невирусные, неинтегрируемые в геном эписомные вектора [115]. Затем трансфицировали 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 с СМА. В результате наблюдали некоторые 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 [115].

Известно, что при СМА патологические изменения происходят и в других типах клеток, включая астроциты, сенсорные нейроны, шванновские клетки, скелетные мышечные волокна [120–124]. Влияют ли на прогрессирующую дегенерацию моторных нейронов сенсорные нейроны с мутацией в гене *SMN1*? Использование ИПСК от пациентов со СМА типа I помогает ответить на этот вопрос.

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 [125]. Совместное куль-

тивирование 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*.

Применение современных методов геномной инженерии для создания искусственных модельных систем

Современные методы редактирования генома, основанные на технологиях ZFN (Zinc-finger Nucleases; нуклеазы, содержащие домен цинковые пальцы), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases; эффлекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9; короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга), позволяют получать искусственные модельные системы как *in vitro*, так и *in vivo*. С их помощью можно не только вводить ту или иную мутацию в геном исследуемого объекта, но и исправлять мутации [126–134].

В настоящее время технологии TALEN и CRISPR/Cas9 могут применяться в фундаментальных и трансляционных биомедицинских исследованиях и в экспериментах по проверке гипотез и принципов геномной и клеточной терапии. Помимо создания моделей для разработки подходов к лечению, искусственные нуклеазы могут быть использованы непосредственно в терапевтических целях. Одно из таких направлений – терапия хронических вирусных инфекций [135–138].

С помощью пары ZFN удалось исправить мутацию замены Ala4Val в гене *SOD1* в ИПСК [59]. Причем были получены гетерозиготные и гомозиготные клоны клеток (*SOD1*^{+/A4V} и *SOD1*^{+/+}). Эти клетки использовали для дальнейшего изучения функций мутантного белка *SOD1* и в качестве изогенного контроля.

Клеточная терапия БМН

Клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний предполагает замещение новыми здоровыми клетками поврежденной нервной ткани и восстановление нарушенных функций. Так, мотонейроны, полученные из ЭСК человека, трансплантировали в куриные эмбрионы, где они приживались и поддерживали свою клеточную специфичность, кроме того их аксоны выходили за пределы ЦНС и достигали своих периферических мышечных мишеней

Источники получения моторных нейронов

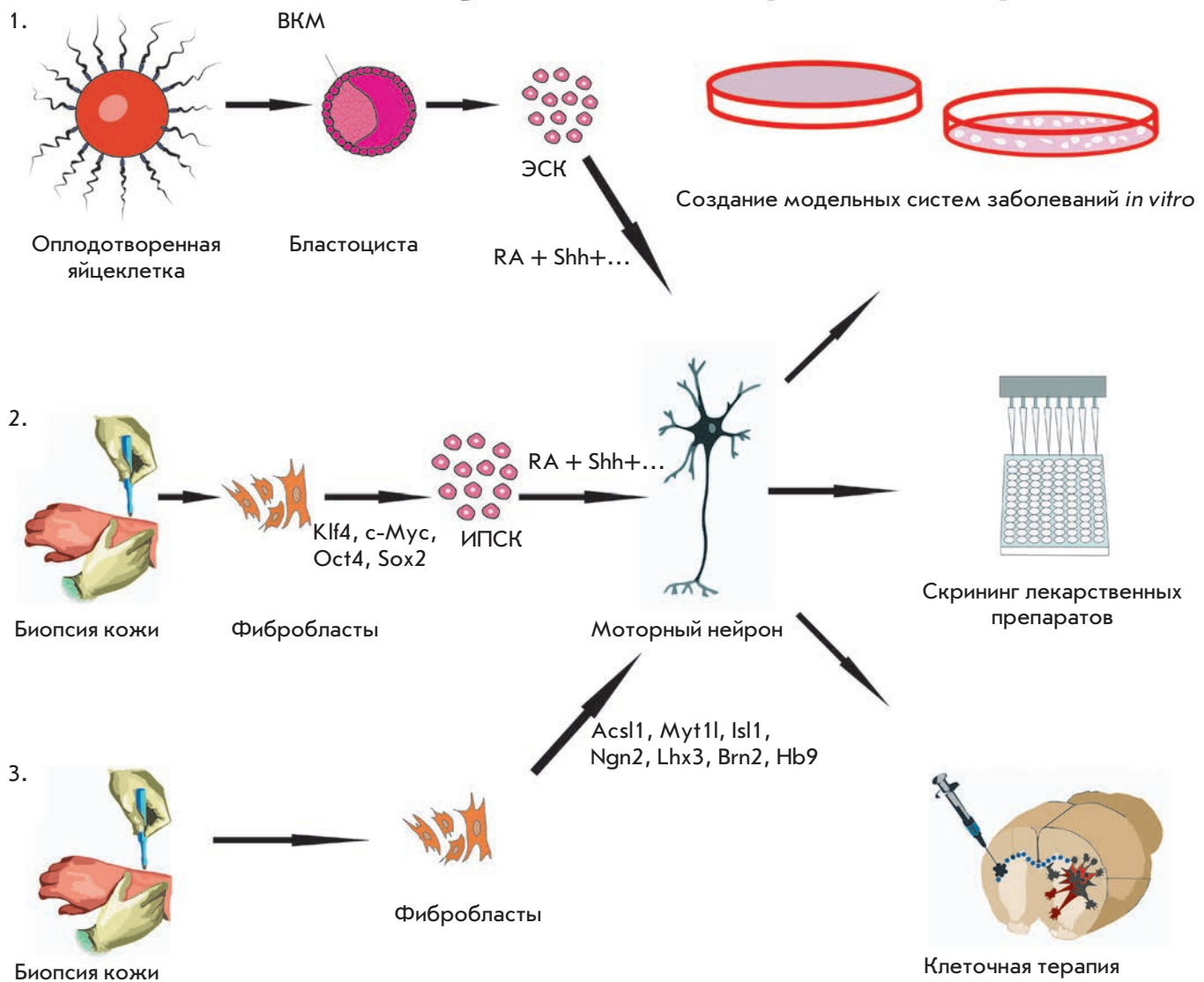


Рис. 3. Источники получения моторных нейронов. 1 – ЭСК, полученные из внутренней клеточной массы бластоцисты, можно дифференцировать в моторные нейроны, ключевую роль в данном процессе играют такие соединения, как RA и Shh. 2 – фибробласты человека, полученные из материала биопсии кожи, можно репрограммировать в ИПСК путем экспрессии в них таких факторов, как Klf4, c-Мус, Oct4 и Sox2. Дифференцировку ИПСК в моторные нейроны производят способом, описанным для ЭСК. 3 – непосредственно из фибробластов можно получить моторные нейроны путем экспрессии в них семи факторов (Acsl1, Myt1l, Isl1, Ngn2, Lhx3, Brn2, Hb9)

[139]. Аналогичные клетки, трансплантированные в спинной мозг взрослых крыс, также приживались в чужеродной ткани. Через 6 месяцев после операции обнаруживалось некоторое количество клеток, экспрессирующих маркер мотонейронов – холин-аденозилтрансферазу. Большого эффекта позволяет достичь котрансплантация нейтральных стволовых клеток, секретирующих в пораженную область глиальный нейротрофический фактор, и дополни-

тельное введение этим животным ингибитора фосфодиэстеразы-4 и циклического дибутуриладенозинмонофосфата, веществ, которые стимулируют выход аксонов на периферию [140]. Стимулировать образование нервно-мышечных синапсов позволяет трансплантация моторных нейронов в дистальные концы периферических нервов у мыши [141–143]. При этом отмечается образование функциональных синапсов, сохраняющихся через 6–18 месяцев после

операции. А дополнительная электрическая стимуляция приживленных клеток обеспечивает реиннервацию атрофированных мышечных волокон [143].

Операции по пересадке моторных нейронов по-прежнему сопряжены с трудностями технического характера и иммунологическими реакциями. Однако трансплантация дифференцированных производных ИПСК позволяет избежать проблем тканевой несовместимости, наблюдаемых при использовании производных ЭСК. Кроме того, дальнейшего изучения требуют вопросы котрансплантации клеток микроокружения, формирования функциональных нервно-мышечных синапсов на периферии, повышения выживаемости и времени функционирования трансплантированных клеток.

Проблема направленной дифференцировки моторных нейронов и масштабирования экспериментов для проведения фармакологических исследований

В настоящее время получить моторные нейроны можно из трех источников (рис. 3):

- ЭСК;
- ИПСК;
- фибробластов.

Разработка протоколов быстрой и эффективной дифференцировки ЭСК и ИПСК чрезвычайно важна, поскольку именно дифференцированные производные этих клеток необходимы для широкомасштабного использования в фармакологических, токсикологических исследованиях и заместительной клеточной терапии. В настоящее время разработано большое число протоколов направленной дифференцировки культивируемых плюрипотентных клеток человека и мыши в моторные нейроны [71, 75, 115, 144–153]. Данная процедура включает два этапа. Первый этап – проведение нейрональной дифференцировки с формированием эмбрионидных телец или нейральных розеток. Этот этап проводится в среде для ЭСК с добавлением специфических факторов, направляющих дифференцировку в нейральном направлении. Второй этап – дифференцировка полученных нейральных предшественников в направлении моторных нейронов путем добавления в среду таких факторов, как RA (retinoic acid – ретиноевая кислота) и Shh (sonic hedgehog – сигнальный белок Hedgehog). Эффективность процедуры оценивают по экспрессии специфических маркеров, морфологии клеток, их электрофизиологической активности, а также путем ксенотрансплантации животным. Полученные клетки представляют собой смешанную популяцию. Обогащить ее моторными нейронами можно с помощью градиентного центрифугирования [115] или же протоколов с более высоким выходом требуемых клеток.

Протоколы, в которых используется индукция эмбрионидных телец с последующей обработкой RA/Shh, довольно трудоемкие, они занимают в общей сложности около 2 месяцев и дают относительно низкий выход моторных нейронов (10–40%). Метод направленного программирования, основанный на аденовирусной доставке трех специфических для мотонейронов факторов транскрипции, Ngn2, ISL1 и Lhx3, быстрее (мотонейроны из нейральных предшественников формируются в течение 11 дней) и эффективнее (популяция мотонейронов составляет порядка 60%). Недостатками такого метода являются:

- относительно небезопасные для дальнейшего использования этих клеток манипуляции с геномами, основанные на применении аденовирусов;
- значительные колебания количества получаемых на выходе мотонейронов, а также вариабельности их выживаемости.

Однако уже разработаны протоколы, позволяющие довольно быстро (в течение 20 дней) и с большой эффективностью (свыше 70%) получать моторные нейроны без использования аденовирусов [154].

Дальнейшие усилия 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 на изучение способов направленной дифференцировки клеток в конкретные подтипы мотонейронов.

Проблема создания биобанков клеточных моделей

Для осуществления фармакологических, токсикологических исследований и клеточной терапии важнейшим условием является доступность клеточных образцов, полученных от больных редкими заболеваниями. Отсюда возникает острая необходимость в создании банков линий ЭСК и ИПСК человека. Подобная задача требует высокого уровня компетентности сотрудников, создания специализированной инфраструктуры, строгого контроля качества образцов. Мировое научное сообщество давно озабочено данной проблемой. Критерии, которым должны удовлетворять банки линий ЭСК и ИПСК человека, рассмотрены в новых программах, таких, как CCRM (<http://ccrm.ca/>), CIRM (<http://www.coriell.org/media-center/coriell-in-the-news/coriell-awarded-10mm-for-induced-pluripotent-stem-cell-program>), HiPSCi (<http://www.hipsci.org>) и StemBANCC (<http://www.stembancc.org/>).

Одним из возможных способов реализации этой важнейшей задачи может стать платформа на основе краудсорсинга (crowdsourcing – crowd – толпа и sourcing – использование ресурсов, т.е. мобилизации ресурсов посредством информационных

технологий с целью решения задач, стоящих перед бизнесом, государством и обществом в целом), как, например, это уже имеет место в таких ресурсах, как The Zebrafish Gene Collection, ADDGENE, PubMed и the Drosophila «Red Book». В США уже существует прообраз подобной организации, базой для которой являются NIH (the National Institutes of Health, в частности NCATS (National Center for Advanced Translational Science) и NIHCRM (the NIH Center for Regenerative Medicine)). В коллекциях трех организаций RUCDR Infinite Biologics (Rutgers), the Coriell Institute for Medical Research (Coriell) и Wisconsin Stem Cell Bank (WISC) уже имеются сотни клеточных линий ЭСК и ИПСК, полученных от различных институтов.

Таким образом, для создания биобанков клеточных моделей необходимо решить ряд вопросов. Первый связан с объединением усилий международного сообщества, направленных на то, чтобы исследователи всего мира имели свободный доступ к подобному биобанку. Немаловажной является проблема биологической безопасности, а также соответствие биобанка законодательным базам разных стран. Второй вопрос – создание единой базы данных, в которой должны быть прописаны все необходимые характеристики клеточных линий. Третий вопрос связан с быстрым прогрессом в области клеточных технологий. Менее чем за 10 лет после своего создания технология ИПСК достигла такого уровня развития, что уже позволяет использовать эти клетки в доклинических исследованиях лекарственных препаратов, а также начать их применение в области регенеративной и персонализированной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема нейродегенеративных заболеваний и поиска способов их лечения становится одной из наиболее актуальных в связи с увеличением средней продолжительности жизни в развитых странах, поскольку большая часть этих болезней развивается у лиц пожилого и старческого возраста. Болезни моторных нейронов не занимают ведущей позиции в общей структуре смертности от нейродегенеративных заболеваний, но по тяжести течения и скорости летального исхода они являются безусловными лидерами. Боковой амиотрофический склероз (БАС)

приводит к прогрессирующей мышечной атрофии и смерти в результате дыхательной недостаточности в течение 2–5 лет, а наиболее тяжелая форма спинальной мышечной атрофии (СМА), болезнь Вердника–Гоффмана, приводит к мышечной атрофии, параличу и смерти больных детей в течение первых 2 лет жизни.

Моделирование БМН в системах *in vivo* на таких организмах, как нематода, дрозофила, лабораторные мыши и крысы, существенно расширило наши представления о причинах и механизмах патогенеза БМН, позволило выявить ряд химических соединений, которые можно будет использовать в терапии этих болезней. Однако на генетическом и фенотипическом уровне подобные модели сильно отличаются от того, что наблюдается при БМН у человека. Поэтому для получения релевантных модельных систем на сегодняшний день активно используют дифференцированные производные ЭСК и ИПСК. С их помощью можно не только изучать особенности заболеваний на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях, но и использовать эти клетки в дальнейшем для заместительной терапии и скрининга 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.

Важнейшая задача, которую необходимо решить на пути к достижению этого этапа, – это создание общедоступных банков линий ЭСК и ИПСК, содержащих максимально полную информацию о каждой клеточной линии. На сегодняшний день в этом направлении наиболее активно работают Национальные институты здоровья в США и ряд организаций в некоторых развитых странах. Однако для создания наиболее полного банка линий ЭСК и ИПСК необходимо объединение усилий всего мирового научного сообщества, в том числе научных организаций и учреждений Российской Федерации. ●

Работа финансировалась в рамках программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2.1.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen P.M., Al-Chalabi A. // Nat. Rev. Neurol. 2011. V. 7. № 11. P. 603–615.
2. Faravelli I., Bucchia M., Rinchetti P., Nizzardo M., Simone C., Frattini E., Corti S. // Stem Cell Res. Ther. 2014. V. 5. № 4. P. 87.
3. Simone C., Nizzardo M., Rizzo F., Ruggieri M., Riboldi G., Salani S., Bucchia M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. // Stem Cell Repts. 2014. V. 3. № 2. P. 297–311.
4. Boiani M., Scholer H.R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. № 11. P. 872–884.
5. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // Nature. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
6. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.

7. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
8. Lunn J.S., Sakowski S.A., Federici T., Glass J.D., Boulis N.M., Feldman E.L. // *Regen. Med*. 2011. V. 6. № 2. P. 201–213.
9. Amemori T., Romanyuk N., Jendelova P., Herynek V., Turnovcova K., Prochazka P., Kapcalova M., Cocks G., Price J., Sykova E. // *Stem Cell Res. Ther*. 2013. V. 4. № 3. P. 68.
10. Rossi F., Cattaneo E. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2002. V. 3. № 5. P. 401–409.
11. Rosser A.E., Zietlow R., Dunnett S.B. // *Curr. Opin. Neurol*. 2007. V. 20. № 6. P. 688–692.
12. Klein S.M., Behrstock S., Mchugh J., Hoffmann K., Wallace K., Suzuki M., Aebischer P., Svendsen C.N. // *Hum. Gene Ther*. 2005. V. 16. № 4. P. 509–521.
13. Mulder D.W. // *Adv. Neurol*. 1982. V. 36. P. 15–22.
14. Gordon P.H. // *Aging Dis*. 2013. V. 4. № 5. P. 295–310.
15. Mcguire V., Longstreth W.T., Jr., Koepsell T.D., van Belle G. // *Neurology*. 1996. V. 47. № 2. P. 571–573.
16. Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chio A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010. V. 81. № 4. P. 385–390.
17. Marin B., Hamidou B., Couratier P., Nicol M., Delzor A., Raymondeau M., Druet-Cabanac M., Lautrette G., Boumediene F., Preux P.M. // *Eur. J. Neurol*. 2014. V. 21. № 10. P. 1292–1300. e1278–9.
18. Kurtzke J.F. // *Adv. Neurol*. 1991. V. 56. P. 245–270.
19. Papapetropoulos S. // *Neurochem. Int*. 2007. V. 50. № 7–8. P. 998–1003.
20. Caller T.A., Field N.C., Chipman J.W., Shi X., Harris B.T., Stommel E.W. // *Amyotroph. Lateral Scler*. 2012. V. 13. № 1. P. 25–32.
21. Vinceti M., Bottecchi I., Fan A., Finkelstein Y., Mandrioli J. // *Rev. Environ. Health*. 2012. V. 27. № 1. P. 19–41.
22. Wang H., O'reilly E.J., Weisskopf M.G., Logroscino G., McCullough M.L., Thun M.J., Schatzkin A., Kolonel L.N., Ascherio A. // *Arch. Neurol*. 2011. V. 68. № 2. P. 207–213.
23. Pupillo E., Messina P., Logroscino G., Zoccollella S., Chio A., Calvo A., Corbo M., Lunetta C., Micheli A., Millul A., et al. // *Eur. J. Neurol*. 2012. V. 19. № 12. P. 1509–1517.
24. Huisman M.H., Seelen M., De Jong S.W., Dorresteyn K.R., van Doormaal P.T., van Der Kooi A.J., De Visser M., Schelhaas H.J., van Den Berg L.H., Veldink J.H. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2013. V. 84. № 9. P. 976–981.
25. Macgowan D.J., Scelsa S.N., Waldron M. // *Neurology*. 2001. V. 57. № 6. P. 1094–1097.
26. Steele A.J., Al-Chalabi A., Ferrante K., Cudkowicz M.E., Brown R.H., Jr., Garson J.A. // *Neurology*. 2005. V. 64. № 3. P. 454–458.
27. Abel O., Powell J.F., Andersen P.M., Al-Chalabi A. // *Hum. Mutat*. 2012. V. 33. № 9. P. 1345–1351.
28. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M., Finch N.A., Flynn H., Adamson J., et al. // *Neuron*. 2011. V. 72. № 2. P. 245–256.
29. Majounie E., Renton A.E., Mok K., Dopper E.G., Waite A., Rollinson S., Chio A., Restagno G., Nicolaou N., Simon-Sanchez J., et al. // *Lancet Neurol*. 2012. V. 11. № 4. P. 323–330.
30. Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simon-Sanchez J., Rollinson S., Gibbs J.R., Schymick J.C., Laaksovirta H., van Swieten J.C., Myllykangas L., et al. // *Neuron*. 2011. V. 72. № 2. P. 257–268.
31. Rosen D.R. // *Nature*. 1993. V. 364. № 6435. P. 362.
32. Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., et al. // *Science*. 2008. V. 319. № 5870. P. 1668–1672.
33. Vance C., Rogelj B., Hortobagyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., et al. // *Science*. 2009. V. 323. № 5918. P. 1208–1211.
34. Kwiatkowski T.J., Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vandenburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., et al. // *Science*. 2009. V. 323. № 5918. P. 1205–1208.
35. Greenway M.J., Andersen P.M., Russ C., Ennis S., Cashman S., Donaghy C., Patterson V., Swingler R., Kieran D., Prehn J., et al. // *Nat. Genet*. 2006. V. 38. № 4. P. 411–413.
36. Maruyama H., Morino H., Ito H., Izumi Y., Kato H., Watanabe Y., Kinoshita Y., Kamada M., Nodera H., Suzuki H., et al. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 223–226.
37. Johnson J.O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Gibbs J.R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., et al. // *Neuron*. 2010. V. 68. № 5. P. 857–864.
38. Mackenzie I.R., Rademakers R., Neumann M. // *Lancet Neurol*. 2010. V. 9. № 10. P. 995–1007.
39. Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Cleveland D.W. // *Hum. Mol. Genet*. 2010. V. 19. № R1. P. R46–64.
40. Halawani D., Latterich M. // *Mol. Cell*. 2006. V. 22. № 6. P. 713–717.
41. Al-Sarraj S., King A., Troakes C., Smith B., Maekawa S., Bodi I., Rogelj B., Al-Chalabi A., Hortobagyi T., Shaw C.E. // *Acta Neuropathol*. 2011. V. 122. № 6. P. 691–702.
42. Miller R.G., Mitchell J.D., Lyon M., Moore D.H. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. № 1. P. CD001447.
43. Feiguin F., Godena V.K., Romano G., D'ambrogio A., Klima R., Baralle F.E. // *FEBS Lett*. 2009. V. 583. № 10. P. 1586–1592.
44. Laird A.S., van Hoecke A., De Muynck L., Timmers M., van Den Bosch L., van Damme P., Robberecht W. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 10. P. e13368.
45. Kraemer B.C., Schuck T., Wheeler J.M., Robinson L.C., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Schellenberg G.D. // *Acta Neuropathol*. 2010. V. 119. № 4. P. 409–419.
46. Johnson B.S., Snead D., Lee J.J., McCaffery J.M., Shorter J., Gitler A.D. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. № 30. P. 20329–20339.
47. Arnold E.S., Ling S.C., Huelga S.C., Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Ditsworth D., Kordasiewicz H.B., Mcalonis-Downes M., Platoshyn O., Parone P.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 8. P. E736–745.
48. Stallings N.R., Puttapparthi K., Luther C.M., Burns D.K., Elliott J.L. // *Neurobiol. Dis*. 2010. V. 40. № 2. P. 404–414.
49. Wegorzewska I., Bell S., Cairns N.J., Miller T.M., Baloh R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 44. P. 18809–18814.
50. Wils H., Kleinberger G., Janssens J., Pereson S., Joris G., Cuijt I., Smits V., Ceuterick-De Groote C., Van Broeckhoven C., Kumar-Singh S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 8. P. 3858–3863.
51. Zhou H., Huang C., Chen H., Wang D., Landel C.P., Xia P.Y., Bowser R., Liu Y.J., Xia X.G. // *PLoS Genet*. 2010. V. 6. № 3. P. e1000887.
52. Uchida A., Sasaguri H., Kimura N., Tajiri M., Ohkubo T., Ono F., Sakaue F., Kanai K., Hirai T., Sano T., et al. // *Brain*. 2012. V. 135. Pt 3. P. 833–846.
53. Hicks G.G., Singh N., Nashabi A., Mai S., Bozek G., Klewes L., Arapovic D., White E.K., Koury M.J., Oltz E.M., et al. // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. № 2. P. 175–179.
54. Kuroda M., Sok J., Webb L., Baechtold H., Urano F., Yin Y., Chung P., De Rooij D.G., Akhmedov A., Ashley T., et al. // *EMBO J*. 2000. V. 19. № 3. P. 453–462.
55. Fujii R., Okabe S., Urushido T., Inoue K., Yoshimura A., Tachibana T., Nishikawa T., Hicks G.G., Takumi T. // *Curr. Biol*. 2005. V. 15. № 6. P. 587–593.
56. Mitchell J.C., Mcgoldrick P., Vance C., Hortobagyi T.,

- Sreedharan J, Rogelj B, Tudor E.L., Smith B.N., Klasek C., Miller C.C., et al. // *Acta Neuropathol.* 2013. V. 125. № 2. P. 273–288.
57. Huang C., Zhou H., Tong J., Chen H., Liu Y.J., Wang D., Wei X., Xia X.G. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 3. P. e1002011.
58. Chen H., Qian K., Du Z., Cao J., Petersen A., Liu H., Blackburn L.W.T., Huang C.L., Errigo A., Yin Y., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 14. № 6. P. 796–809.
59. Kiskinis E., Sandoe J., Williams L.A., Boulting G.L., Moccia R., Wainger B.J., Han S., Peng T., Thams S., Mikkilineni S., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 14. № 6. P. 781–795.
60. Wainger B.J., Kiskinis E., Mellin C., Wiskow O., Han S.S., Sandoe J., Perez N.P., Williams L.A., Lee S., Boulting G., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 7. № 1. P. 1–11.
61. Yang Y.M., Gupta S.K., Kim K.J., Powers B.E., Cerqueira A., Wainger B.J., Ngo H.D., Rosowski K.A., Schein P.A., Ackeifi C.A., et al. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 6. P. 713–726.
62. Koh S.H., Baek W., Kim S.H. // *Neurol. Res. Int.* 2011. V. 2011. P. 205761.
63. Hetman M., Xia Z. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 2000. V. 60. № 4. P. 531–545.
64. Linseman D.A., Butts B.D., Precht T.A., Phelps R.A., Le S.S., Laessig T.A., Bouchard R.J., Florez-Mcclure M.L., Heidenreich K.A. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 44. P. 9993–10002.
65. Serio A., Bilican B., Barmada S.J., Ando D.M., Zhao C., Siller R., Burr K., Haghi G., Story D., Nishimura A.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 12. P. 4697–4702.
66. Di Giorgio F.P., Carrasco M.A., Siao M.C., Maniatis T., Eggan K. // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. № 5. P. 608–614.
67. Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W. // *Neuron.* 2013. V. 79. № 3. P. 416–438.
68. Bilican B., Serio A., Barmada S.J., Nishimura A.L., Sullivan G.J., Carrasco M., Phatnani H.P., Puddifoot C.A., Story D., Fletcher J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 15. P. 5803–5808.
69. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 145. P. 145ra104.
70. Nishimura A.L., Shum C., Scotter E.L., Abdelgany A., Sardone V., Wright J., Lee Y.B., Chen H.J., Bilican B., Carrasco M., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. P. e91269.
71. Sareen D., O'rourke J.G., Meera P., Muhammad A.K., Grant S., Simpkinson M., Bell S., Carmona S., Ornelas L., Sahabian A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 208. P. 208ra149.
72. Buratti E., Brindisi A., Giombi M., Tisminetzky S., Ayala Y.M., Baralle F.E. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 45. P. 37572–37584.
73. Kim H.J., Kim N.C., Wang Y.D., Scarborough E.A., Moore J., Diaz Z., Maclea K.S., Freibaum B., Li S., Molliex A., et al. // *Nature.* 2013. V. 495. № 7442. P. 467–473.
74. Xu Z., Poidevin M., Li X., Li Y., Shu L., Nelson D.L., Li H., Hales C.M., Gearing M., Wingo T.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 19. P. 7778–7783.
75. Burkhardt M.F., Martinez F.J., Wright S., Ramos C., Volfson D., Mason M., Garnes J., Dang V., Lievers J., Shoukat-Mumtaz U., et al. // *Mol. Cell Neurosci.* 2013. V. 56. P. 355–364.
76. Burghes A.H., Beattie C.E. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 8. P. 597–609.
77. Lunn M.R., Wang C.H. // *Lancet.* 2008. V. 371. № 9630. P. 2120–2133.
78. Monani U.R. // *Neuron.* 2005. V. 48. № 6. P. 885–896.
79. Emery A.E. // *J. Med. Genet.* 1971. V. 8. № 4. P. 481–495.
80. Hahnen E., Forker R., Marke C., Rudnik-Schoneborn S., Schonling J., Zerres K., Wirth B. // *Hum. Mol. Genet.* 1995. V. 4. № 10. P. 1927–1933.
81. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M., et al. // *Cell.* 1995. V. 80. № 1. P. 155–165.
82. Burglen L., Lefebvre S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Cruaud C., Munnich A., Melki J. // *Genomics.* 1996. V. 32. № 3. P. 479–482.
83. Cartegni L., Hastings M.L., Calarco J.A., De Stanchina E., Krainer A.R. // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 78. № 1. P. 63–77.
84. Kashima T., Manley J.L. // *Nat. Genet.* 2003. V. 34. № 4. P. 460–463.
85. Campbell L., Potter A., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. № 1. P. 40–50.
86. Mailman M.D., Heinz J.W., Papp A.C., Snyder P.J., Sedra M.S., Wirth B., Burghes A.H., Prior T.W. // *Genet. Med.* 2002. V. 4. № 1. P. 20–26.
87. Rodrigues N.R., Owen N., Talbot K., Patel S., Muntoni F., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K.E. // *J. Med. Genet.* 1996. V. 33. № 2. P. 93–96.
88. Zheleznyakova G.Y., Kiselev A.V., Vakhlovsky V.G., Rask-Andersen M., Chavan R., Egorova A.A., Schiöth H.B., Baranov V.S. // *BMC Med. Genet.* 2011. V. 12. P. 96.
89. Munsat T.L., Davies K.E. // *Neuromuscul. Disord.* 1992. V. 2. № 5–6. P. 423–428.
90. 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., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10337–10342.
91. Mcwhorter M.L., Monani U.R., Burghes A.H., Beattie C.E. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. № 5. P. 919–931.
92. Meister G., Buhler D., Pillai R., Lottspeich F., Fischer U. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. № 11. P. 945–949.
93. Pellizzoni L., Yong J., Dreyfuss G. // *Science.* 2002. V. 298. № 5599. P. 1775–1779.
94. Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., Kroning A.K., Karle K., Monani U.R., Sendtner M. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 163. № 4. P. 801–812.
95. Pellizzoni L. // *EMBO Rep.* 2007. V. 8. № 4. P. 340–345.
96. Eggert C., Chari A., Lagerbauer B., Fischer U. // *Trends Mol. Med.* 2006. V. 12. № 3. P. 113–121.
97. Gabanella F., Butchbach M.E., Saieva L., Carissimi C., Burghes A.H., Pellizzoni L. // *PLoS One.* 2007. V. 2. № 9. P. e921.
98. Giavazzi A., Setola V., Simonati A., Battaglia G. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006. V. 65. № 3. P. 267–277.
99. Carrel T.L., Mcwhorter M.L., Workman E., Zhang H., Wolstencroft E.C., Lorson C., Bassell G.J., Burghes A.H., Beattie C.E. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 43. P. 11014–11022.
100. Fan L., Simard L.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 14. P. 1605–1614.
101. Schrank B., Gotz R., Gunnarsen J.M., Ure J.M., Toyka K.V., Smith A.G., Sendtner M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 18. P. 9920–9925.
102. Chan Y.B., Miguel-Aliaga I., Franks C., Thomas N., Trulzsch B., Sattelle D.B., Davies K.E., van Den Heuvel M. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. № 12. P. 1367–1376.
103. Frugier T., Tiziano F.D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M., Melki J. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 849–858.
104. Cifuentes-Diaz C., Frugier T., Tiziano F.D., Lacene E., Roblot N., Joshi V., Moreau M.H., Melki J. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 152. № 5. P. 1107–1114.
105. Vitte J.M., Davoult B., Roblot N., Mayer M., Joshi V., Courageot S., Tronche F., Vadrot J., Moreau M.H., Kemeny F., et al. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 165. № 5. P. 1731–1741.
106. Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J., Wu M.H., Wang N.M., Tsai C.H., Li H. // *Nat. Genet.* 2000. V. 24. № 1. P. 66–70.

107. Monani U.R., Sendtner M., Coovert D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossoll W., Prior T.W., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 3. P. 333–339.
108. Gavrilina T.O., MCGovern V.L., Workman E., Crawford T.O., Gogliotti R.G., Didonato C.J., Monani U.R., Morris G.E., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 8. P. 1063–1075.
109. Sleigh J.N., Buckingham S.D., Esmaceli B., Viswanathan M., Cuppen E., Westlund B.M., Sattelle D.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 2. P. 245–260.
110. Coque E., Raoul C., Bowerman M. // *Front Neurosci.* 2014. V. 8. P. 271.
111. 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., Schioth H.B. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2013. V. 21. № 9. P. 988–993.
112. 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., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 9. P. e3209.
113. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., Mattis V.B., Lorson C.L., Thomson J.A., Svendsen C.N. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7227. P. 277–280.
114. Sareen D., Ebert A.D., Heins B.M., MCGivern J.V., Ornelas L., Svendsen C.N. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 6. P. e39113.
115. Corti S., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Nardini M., Ronchi D., Donadoni C., Salani S., Riboldi G., Magri F., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2012. V. 4. № 165. P. 165ra162.
116. Liu Q., Dreyfuss G. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 14. P. 3555–3565.
117. 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., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 8. P. 1205–1214.
118. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G., Melki J. // *Nat. Genet.* 1997. V. 16. № 3. P. 265–269.
119. Young P.J., Le T.T., Thi Man N., Burghes A.H., Morris G.E. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 256. № 2. P. 365–374.
120. Gogliotti R.G., Quinlan K.A., Barlow C.B., Heier C.R., Heckman C.J., Didonato C.J. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 11. P. 3818–3829.
121. Jablonka S., Karle K., Sandner B., Andreassi C., Von Au K., Sendtner M. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 3. P. 511–518.
122. Ling K.K., Lin M.Y., Zing B., Feng Z., Ko C.P. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 11. P. e15457.
123. Voigt T., Meyer K., Baum O., Schumperli D. // *Neuromuscul Disord.* 2010. V. 20. № 11. P. 744–752.
124. Murray L.M., Beauvais A., Bhanot K., Kothary R. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 49C. P. 57–67.
125. Schwab A.J., Ebert A.D. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e103112.
126. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 12. P. e82.
127. Horii T., Tamura D., Morita S., Kimura M., Hatada I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 10. P. 19774–19781.
128. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., van Der Ent C.K., et al. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 13. № 6. P. 653–658.
129. Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.L. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 1. P. 220–228.
130. Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X., Zhu X., Xiong J.W., Xi J.J. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 4. P. 465–472.
131. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
132. Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 681–683.
133. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., Dicarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
134. Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 686–688.
135. Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Jouvenot Y., Dekelver R.C., Gregory P.D., Urnov F.D., Holmes M.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 9. P. 3055–3060.
136. Bloom K., Ely A., Mussolino C., Cathomen T., Arbuthnot P. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 10. P. 1889–1897.
137. Schiffer J.T., Aubert M., Weber N.D., Mintzer E., Stone D., Jerome K.R. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 17. P. 8920–8936.
138. Holt N., Wang J., Kim K., Friedman G., Wang X., Taupin V., Crooks G.M., Kohn D.B., Gregory P.D., Holmes M.C., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 839–847.
139. Lee H., Shamy G.A., Elkabetz Y., Schofield C.M., Harrision N.L., Panagiotakos G., Socci N.D., Tabar V., Studer L. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 8. P. 1931–1939.
140. Deshpande D.M., Kim Y.S., Martinez T., Carmen J., Dike S., Shats I., Rubin L.L., Drummond J., Krishnan C., Hoke A., et al. // *Ann. Neurol.* 2006. V. 60. № 1. P. 32–44.
141. Craff M.N., Zeballos J.L., Johnson T.S., Ranka M.P., Howard R., Motarjem P., Randolph M.A., Winograd J.M. // *Plast Reconstr. Surg.* 2007. V. 119. № 1. P. 235–245.
142. Kubo T., Randolph M.A., Groger A., Winograd J.M. // *Plast Reconstr. Surg.* 2009. V. 123. № 2 Suppl. P. 139S–148S.
143. Yohn D.C., Miles G.B., Rafuse V.F., Brownstone R.M. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 47. P. 12409–12418.
144. Reinhardt P., Glatza M., Hemmer K., Tsytsyura Y., Thiel C.S., Hoing S., Moritz S., Parga J.A., Wagner L., Bruder J.M., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e59252.
145. 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., et al. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 2. P. 574–586.
146. 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., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 3. P. 279–286.
147. 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., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 10. P. 1905–1912.
148. Hu B.Y., Du Z.W., Zhang S.C. // *Nat-Protoc.* 2009. V. 4. № 11. P. 1614–1622.
149. 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., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 4. P. 806–811.
150. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. // *Cell.* 2002. V. 110. № 3. P. 385–397.
151. Takazawa T., Croft G.F., Amoroso M.W., Studer L., Wichterle H., Macdermott A.B. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e40154.
152. Wada T., Honda M., Minami I., Tooi N., Amagai Y., Nakatsuji N., Aiba K. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 8. P. e6722.
153. Zeng H., Guo M., Martins-Taylor K., Wang X., Zhang Z., Park J.W., Zhan S., Kronenberg M.S., Lichtler A., Liu H.X., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 7. P. e11853.
154. Qu Q., Li D., Louis K.R., Li X., Yang H., Sun Q., Crandall S.R., Tsang S., Zhou J., Cox C.L., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3449.
155. Lu L., Li Y., Kim S.M., Bossuyt W., Liu P., Qiu Q., Wang Y.,

- Halder G., Finegold M.J., Lee J.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 4. P. 1437–1442.
156. Bastow E.L., Gourlay C.W., Tuite M.F. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. № 5. P. 1482–1487.
157. Couthouis J., Hart M.P., Shorter J., Dejesus-Hernandez M., Erion R., Oristano R., Liu A.X., Ramos D., Jethava N., Hosangadi D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 52. P. 20881–20890.
158. Martins D., English A.M. // *Redox Biol.* 2014. V. 2. P. 632–639.
159. Oeda T., Shimohama S., Kitagawa N., Kohno R., Imura T., Shibasaki H., Ishii N. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 19. P. 2013–2023.
160. Vaccaro A., Tauffenberger A., Aggad D., Rouleau G., Drapeau P., Parker J.A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. P. e31321.
161. Gidalevitz T., Krupinski T., Garcia S., Morimoto R.I. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000399.
162. Wang J., Farr G.W., Hall D.H., Li F., Furtak K., Dreier L., Horwich A.L. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 1. P. e1000350.
163. Ash P.E., Zhang Y.J., Roberts C.M., Saldi T., Hutter H., Buratti E., Petrucelli L., Link C.D. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 16. P. 3206–3218.
164. Liachko N.F., Guthrie C.R., Kraemer B.C. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 48. P. 16208–16219.
165. Watson M.R., Lagow R.D., Xu K., Zhang B., Bonini N.M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 36. P. 24972–24981.
166. Lanson N.A., Jr., Maltare A., King H., Smith R., Kim J.H., Taylor J.P., Lloyd T.E., Pandey U.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 13. P. 2510–2523.
167. Wang J.W., Brent J.R., Tomlinson A., Shneider N.A., McCabe B.D. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 10. P. 4118–4126.
168. Xia R., Liu Y., Yang L., Gal J., Zhu H., Jia J. // *Mol. Neurodegener.* 2012. V. 7. P. 10.
169. Miguel L., Avequin T., Delarue M., Feuillette S., Frebourg T., Campion D., Lecourtois M. // *Neurobiol. Aging*. 2012. V. 33. № 5. P. 1008. e1–15.
170. Li Y., Ray P., Rao E.J., Shi C., Guo W., Chen X., Woodruff E.A., 3rd, Fushimi K., Wu J.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 7. P. 3169–3174.
171. Lu Y., Ferris J., Gao F.B. // *Mol. Brain*. 2009. V. 2. P. 30.
172. Hanson K.A., Kim S.H., Wassarman D.A., Tibbetts R.S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 15. P. 11068–11072.
173. Elden A.C., Kim H.J., Hart M.P., Chen-Plotkin A.S., Johnson B.S., Fang X., Armarkola M., Geser F., Greene R., Lu M.M., et al. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7310. P. 1069–1075.
174. Ramesh T., Lyon A.N., Pineda R.H., Wang C., Janssen P.M., Canan B.D., Burghes A.H., Beattie C.E. // *Dis. Model Mech.* 2010. V. 3. № 9–10. P. 652–662.
175. Bosco D.A., Lemay N., Ko H.K., Zhou H., Burke C., Kwiatkowski T.J., Jr., Sapp P., Mckenna-Yasek D., Brown R.H., Jr., Hayward L.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 21. P. 4160–4175.
176. Kabashi E., Bercier V., Lissouba A., Liao M., Brustein E., Rouleau G.A., Drapeau P. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 8. P. e1002214.
177. Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y., Dal Canto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X., et al. // *Science*. 1994. V. 264. № 5166. P. 1772–1775.
178. Deng H.X., Shi Y., Furukawa Y., Zhai H., Fu R., Liu E., Gorrie G.H., Khan M.S., Hung W.Y., Bigio E.H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 18. P. 7142–7147.
179. Wong P.C., Pardo C.A., Borchelt D.R., Lee M.K., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sisodia S.S., Cleveland D.W., Price D.L. // *Neuron*. 1995. V. 14. № 6. P. 1105–1116.
180. Chang-Hong R., Wada M., Koyama S., Kimura H., Arawaka S., Kawanami T., Kurita K., Kadoya T., Aoki M., Itoyama Y., et al. // *Exp. Neurol.* 2005. V. 194. № 1. P. 203–211.
181. Wang J., Xu G., Gonzales V., Coonfield M., Fromholt D., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. // *Neurobiol. Dis.* 2002. V. 10. № 2. P. 128–138.
182. Wang J., Slunt H., Gonzales V., Fromholt D., Coonfield M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Borchelt D.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. № 21. P. 2753–2764.
183. Wang L., Deng H.X., Grisotti G., Zhai H., Siddique T., Roos R.P. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 9. P. 1642–1651.
184. Wang J., Ma J.H., Giffard R.G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2005. V. 38. № 8. P. 1112–1118.
185. Deng H.X., Jiang H., Fu R., Zhai H., Shi Y., Liu E., Hirano M., Dal Canto M.C., Siddique T. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 15. P. 2310–2319.
186. Jonsson P.A., Graffmo K.S., Andersen P.M., Brannstrom T., Lindberg M., Oliveberg M., Marklund S.L. // *Brain*. 2006. V. 129. Pt 2. P. 451–464.
187. Watanabe Y., Yasui K., Nakano T., Doi K., Fukada Y., Kitayama M., Ishimoto M., Kurihara S., Kawashima M., Fukuda H., et al. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. V. 135. № 1–2. P. 12–20.
188. Nagai M., Aoki M., Miyoshi I., Kato M., Pasinelli P., Kasai N., Brown R.H., Jr., Itoyama Y. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 23. P. 9246–9254.
189. Howland D.S., Liu J., She Y., Goad B., Maragakis N.J., Kim B., Erickson J., Kulik J., Devito L., Psaltis G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 3. P. 1604–1609.
190. Xu Y.F., Gendron T.F., Zhang Y.J., Lin W.L., D'Alton S., Sheng H., Casey M.C., Tong J., Knight J., Yu X., et al. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 32. P. 10851–10859.
191. Shan X., Chiang P.M., Price D.L., Wong P.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 37. P. 16325–16330.
192. Igaz L.M., Kwong L.K., Lee E.B., Chen-Plotkin A., Swanson E., Unger T., Malunda J., Xu Y., Winton M.J., Trojanowski J.Q., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 2. P. 726–738.
193. Awano T., Johnson G.S., Wade C.M., Katz M.L., Johnson G.C., Taylor J.F., Perloski M., Biagi T., Baranowska I., Long S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 8. P. 2794–2799.
194. Coates J.R., Wininger F.A. // *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2010. V. 40. № 5. P. 929–950.
195. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Njakan K.K., Weisenthal L.M., Mitumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science*. 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.
196. Chestkov I.V., Vasilieva E.A., Illarionov S.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 1. P. 54–60.
197. Owen N., Doe C.L., Mellor J., Davies K.E. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 675–684.
198. Paushkin S., Charroux B., Abel L., Perkinson R.A., Pellizzoni L., Dreyfuss G. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 31. P. 23841–23846.
199. Hannus S., Buhler D., Romano M., Seraphin B., Fischer U. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 5. P. 663–674.
200. Miguel-Aliaga I., Culetto E., Walker D.S., Baylis H.A., Sattelle D.B., Davies K.E. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 12. P. 2133–2143.
201. Briese M., Esmaeili B., Fraboulet S., Burt E.C., Christodoulou S., Towers P.R., Davies K.E., Sattelle D.B. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 1. P. 97–104.
202. Rajendra T.K., Gonsalvez G.B., Walker M.P., Shpargel K.B., Salz H.K., Matera A.G. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 176. № 6. P. 831–841.
203. Workman E., Saieva L., Carrel T.L., Crawford T.O., Liu D., Lutz C., Beattie C.E., Pellizzoni L., Burghes A.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 12. P. 2215–2229.