

УДК 576.3

Система для изучения бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

И. В. Честков^{1*}, Е. А. Васильева¹, С. Н. Иллариошкин², М. А. Лагарькова¹, С. Л. Киселев¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Научный центр неврологии РАМН, 125367, Москва, Волоколамское ш., 8

*E-mail: ichestkov@vigg.ru

Поступила в редакцию 09.09.2013

РЕФЕРАТ Технология генетического репрограммирования позволяет получать плюрипотентные стволовые клетки индивидуально для каждого пациента. Эти клетки, названные индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК), могут стать неограниченным ресурсом для получения специализированных типов клеток. Таким образом, появляется возможность использования аутологичных соматических клеток в заместительной терапии, а также создания *in vitro* моделей для изучения механизмов патогенеза заболеваний и поиска новых лекарственных препаратов. Боковой амиотрофический склероз (БАС) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, при котором наблюдается поражение верхних и нижних двигательных (моторных) нейронов. Примерно в 10% случаев БАС генетически наследуется, и самая распространенная семейная форма этого заболевания ассоциирована с мутациями в гене *SOD1*. Мы использовали технологию репрограммирования для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с семейными формами БАС. Пациент-специфические иПСК получали при помощи интеграционных и неинтеграционных методов доставки транскрипционных факторов репрограммирования. Эти линии иПСК обладали свойствами плюрипотентных клеток и были способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз, дифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, моторные нейроны.

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС, также известный как болезнь моторных нейронов, болезнь Шарко, болезнь Лу Герига) – это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с поздним началом, при котором наблюдается специфическая гибель моторных нейронов спинного и головного мозга. В ходе развития заболевания происходит постепенная деиннервация мышц, и смерть наступает в результате поражения дыхательной мускулатуры. На сегодняшний день не существует эффективной ранней диагностики БАС, поэтому от момента появления первых симптомов до смерти больного проходит не более 5 лет. Большинство случаев БАС (приблизительно 90%) не имеют явной генетической наследуемости и характеризуются как спорадические. Наиболее распространенная семейная форма БАС (ALS1, 20% от всех семейных случаев) ассо-

циирована с аутосомно-доминантными мутациями в гене Cu/Zn-супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*). Охарактеризовано более 170 мутаций в гене *SOD1*, которые приводят к развитию БАС (база данных ALSod от 28.06.2013).

Однако связь между генетическим дефектом и гибелью моторных нейронов до сих пор не обнаружена. Введение в мышей мутантного аллеля гена *SOD1* человека позволило воспроизвести основные симптомы нейродегенерации при БАС и проверить ряд гипотез о патогенетических основах этого заболевания. Было показано, что токсическое действие *SOD1* на моторные нейроны не связано с нарушением или потерей ферментативной активности. У животных, несущих как активные (hSOD1^{G37R} [1], hSOD1^{G93A} [2]), так и неактивные (hSOD1^{G85R} [3], hSOD1^{G127X} [4]) формы фермента, симптомы были сходными с симптомами при БАС, включая потерю

синаптических контактов моторных нейронов [5], нарушение митохондрий [6] и активацию глиальных клеток [7]. Более того, мыши с гомозиготным нокаутом гена *SOD1* не имели никаких признаков нейродегенеративных нарушений [8].

Каталитическая активность *SOD1* зависит от присутствия в активном центре иона меди. Находясь в свободном состоянии, этот ион проявляет крайнюю реакционноспособность и токсичность, поэтому неэффективная доставка в активный центр *SOD1* или нарушение связывания за счет конформационных изменений фермента (в результате мутаций) могут стать причиной внутриклеточных нарушений и гибели моторных нейронов. Однако удаление специализированного шаперона-переносчика меди для *SOD1* (CCS) [9] или мутации в Cu-связывающем сайте фермента [10] не снижали токсическое действие на моторные нейроны у мышей.

Тем не менее конформационные нарушения и токсичность мутантного *SOD1* рассматриваются в настоящее время как основная причина возникновения БАС. В результате утраты ионов меди и цинка, разрыва внутримолекулярных дисульфидных связей происходит диссоциация гомодимерного нативного фермента на мономеры и формируются белковые агрегаты – один из признаков классического БАС [11]. Более того, обнаружение таких белковых агрегатов в моторных нейронах большинства пациентов со спорадическими формами БАС указывает на олигомеризацию *SOD1* как на общую черту данного заболевания независимо от его генотипа [12]. В поддержку конформационной теории говорит и существование форм с различным проявлением и скоростью прогрессии в зависимости от мутации в гене *SOD1*.

Следует отметить, что гибель моторных нейронов при БАС может не быть автономным клеточным процессом, поскольку экспрессия мутантного гена *SOD1* только в мотонейронах не приводит к появлению признаков нейродегенерации у трансгенных мышей [13], в то время как токсический эффект показан для астроцитов [14] и клеток микроглии [7].

Однако результаты, полученные на трансгенных животных, не всегда можно прямо перенести на человека, а системы с повышенной экспрессией мутантного гена *SOD1* могут не воспроизводить действительную картину заболевания на молекулярном уровне. При этом изучение БАС у человека затрудняется труднодоступностью пораженных тканей. Технология генетического репрограммирования позволяет перевести практически любые доступные клетки пациента, например фибробласты кожи [15], эндотелиальные клетки [16, 17], в плюрипотентное состояние. Полученные при этом индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) обладают

всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), включая неограниченный пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке во все типы клеток организма.

В представленной работе получены иПСК для пациентов с семейными формами *SOD1*-ассоциированного БАС путем репрограммирования первичных фибробластов кожи с помощью эктопической экспрессии генов четырех транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4. Полученные линии иПСК охарактеризованы, разработана методика их дифференцировки в моторные нейроны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение культуры фибробластов кожи

Биоптаты кожи размещали под покровные стекла на чашках Петри (Greiner Bio-One), покрытых 0.1% раствором желатина (Sigma), и культивировали в питательной среде DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (Hyclone), 1% раствора заменимых аминокислот (Invitrogen), 2 mM L-глутамина (Invitrogen), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), 4 нг/мл hrbFGF (PeproTech) (среда для фибробластов). При достижении конфлюэнтного монослоя, образующегося примерно на 14 день, клетки пассировали путем обработки 0.25% раствором трипсина (Hyclone). С целью длительного хранения культуры фибробластов клетки замораживали в DMEM с добавлением 20% FBS и 10% ДМСО.

Клеточные культуры

Первичные линии фибробластов кожи культивировали как описано выше. Клетки упаковывающей линии Phoenix культивировали в DMEM с добавлением 5% FBS, термически инактивированной (56°C), 2 mM L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина на чашках Петри, покрытых 0.1% раствором желатина. Линии иПСК культивировали в среде mTeSR1 (STEMCELL Technologies) на чашках Петри, покрытых матригелем (Matrigel, BD). Все клеточные линии культивировали в 5% CO₂ при 37°C.

Получение рекомбинантных лентивирусов

Рекомбинантные лентивирусы получали путем трансфекции упаковывающей клеточной линии Phoenix лентивирусными векторами, кодирующими репрессирующие факторы: LeGO-hOct3/4, LeGO-hSox2, LeGO-hKlf4, LeGO-hc-Мус по ранее описанной методике [18].

Трансфекция фибробластов и получение иПСК

Репрограммирование фибробластов неинтеграционным способом проводили с использова-

нием CytoTune-iPS Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для репрограммирования рекомбинантными лентивирусными частицами фибробласты на первом пассаже рассеивали на 6-луночный планшет (Greiner Bio-One) по 100000 клеток каждой первичной линии на лунку и инкубировали в среде для фибробластов в течение ночи. На следующий день клеткам заменяли среду на свежую, содержащую 8 мкг/мл полибрена (Sigma), инкубировали в течение 1 ч, затем добавляли вирусные частицы всех четырех типов с множественностью заражения 5 для каждого лентивируса. Смену среды проводили 1 раз в 2 дня. На пятый день с момента трансфекции фибробласты, обработанные 0.25% раствором трипсина, пересеивали на подложку из митотически инактивированных митомицином C (10 мкг/мл, Sigma) эмбриональных фибробластов мыши на 10-см чашки Петри, предварительно покрытые 0.1% раствором желатина. На шестой день среду для фибробластов заменяли средой для культивирования ЭСК человека следующего состава: DMEM/F12 (1 : 1) («ПанЭко»), 20% заменителя сыворотки Knockout Serum Replacement (KO SR, Invitrogen), 1% NEAA, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, 0.1 mM β-меркаптоэтанола (Sigma), 4 нг/мл hrbFGF, содержащую ингибитор гистон-метилтрансферазы VIX-01294 (1 мкМ, Sigma), ингибитор деацетилазы гистонов вальпроевую кислоту (1 mM, Sigma). Смену среды осуществляли ежедневно. VIX-01294 и вальпроевую кислоту добавляли в среду в течение 7 дней. Колонии, морфологически не отличимые от колоний ЭСК, были отобраны механически и помещены на подложку из матригеля в среду mTeSR1.

Визуализация активности эндогенной щелочной фосфатазы

С чашек Петри отбирали среду, клетки промывали 2 раза буферным раствором следующего состава: 100 mM Трис-НСl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20, pH 9.5. Затем буферный раствор отбирали и добавляли рабочий раствор: 0.02% BCIP, 0.03% NBT в 0.1 M буфере TBS (Tris-Buffered Saline), pH 9.5. Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали 2 раза буферным раствором и проводили микроскопический анализ с подсчетом позитивно окрашенных колоний.

Кариотипирование и иммуноокрашивание

Препараты метафазных хромосом линий iPSC и иммуноокрашивание проводили как описано в [17].

В качестве первичных антител использовали: мышиные моноклональные антитела к SSEA-4 (1 : 100),

TRA-1-60 (1 : 100), TRA-1-81 (1 : 50) (Cell Signaling Technology); к HB9 (1 : 50, Developmental Hybridoma Bank или DSHB); к βIII-тубулину (1 : 500, Abcam); к виментину (1 : 200, Dako); кроличьи моноклональные антитела против Nanog (1 : 200), Oct4 (1 : 300), Sox2 (1 : 400) (Cell Signaling Technology); кроличьи поликлональные антитела против ChAT, βIII-тубулина, GFAP (1 : 500, Abcam); против α-фетопротейна (1 : 400, Dako). В качестве вторичных антител использовали антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1 : 700), и антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1 : 500).

Для окрашивания ядер использовали DAPI. Препараты анализировали на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Цветные фотографии микрообъектов в псевдоцветах получали с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss).

Формирование эмбрионных тел и дифференцировка *in vitro*

Спонтанную дифференцировку плюрипотентных клеток индуцировали по ранее описанной методике [18].

Нейрональная дифференцировка

Для получения мотонейронов *in vitro* использовали протокол дифференцировки [19] с некоторыми модификациями. Эмбрионные тельца получали с помощью планшета AggreWell400 (STEMCELL Technologies) в среде DMEM/F12 с добавлением 5% заменителя сыворотки Knockout Serum Replacement (KO SR), 1% NEAA, 2 mM L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, 0.1 mM β-меркаптоэтанола, 200 нг/мл рекомбинантного белка Noggin человека (Biological Industries) и 2 мкМ SB431542 (Stemgent) в течение 12 дней. Затем в течение 10 дней эмбрионные тельца культивировали в Neurobasal Medium (Gibco) с добавлением 2 mM L-глутамин, B27 (Gibco), 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 нг/мл рекомбинантного Sonic hedgehog (PeproTech), 10 нг hrbFGF, после чего переносили на чашки Петри, покрытые матригелем в Neurobasal Medium, содержащей 2 mM L-глутамин, по 10 нг/мл BDNF, GDNF (все от PeproTech) и культивировали еще в течение 14 дней. Прикрепленные колонии обрабатывали аккутазой (Sigma), разбивали до одноклеточной суспензии и культивировали на чашках Петри, покрытых матригелем в течение 5 дней, после чего проводили иммуноокрашивание.

Направленную дифференцировку плюрипотентных клеток в астроциты проводили как описано в [20].

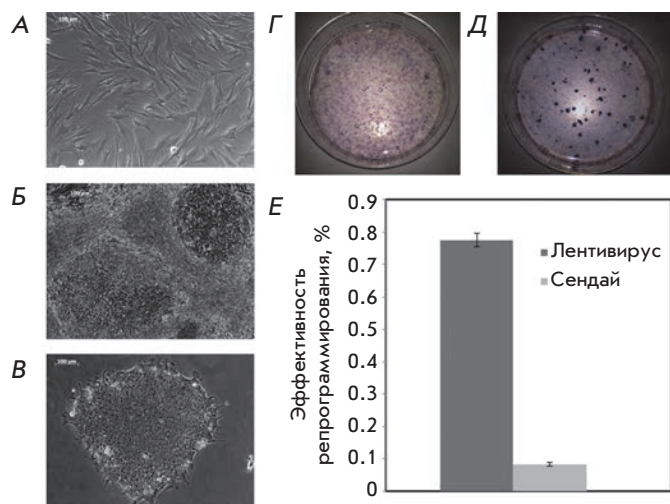


Рис. 1. Получение стабильных линий иПСК и определение эффективности репрограммирования первичных фибробластов кожи пациентов с семейными формами БАС. *А* – первичная культура фибробластов кожи; *Б* – формирование колоний иПСК на 15 день после введения генов репрессирующих факторов; *В* – колония иПСК в бесфидерных условиях культивирования после механического отбора; *Г*, *Д* – визуализация колоний иПСК, полученных с помощью лентивирусных частиц (*Г*) и рекомбинантного вируса Сендай (*Д*), при окраске на активность эндогенной щелочной фосфатазы; *Е* – сравнение эффективности репрограммирования при использовании двух систем

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое репрограммирование фибробластов кожи больных семейной формой БАС

Биоптаты кожи пациентов с охарактеризованными формами БАС были предоставлены Научным центром неврологии РАМН. Из материала биопсий были получены гомогенные культуры первичных фибробластов кожи. Миграция клеток из кожных эксплантов происходила в течение 2 недель до формирования первого монослоя. Не позднее 1–2 пассажа в клеточные культуры с помощью лентивирусной системы доставки или рекомбинантных вирусов Сендай были введены гены четырех факторов транскрипции – *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*. Для повышения эффективности генетического репрограммирования в среду культивирования добавляли низкомолекулярные соединения: ингибитор гистон-метилтрансферазы (VIX-01294) [21] и ингибитор деацетилазы гистонов (вальпроевая кислота) [22]. Индукция плюрипотентного состояния в соматических клетках сопровождается целым каскадом эпигенетических событий,

Сравнение профилей коротких tandemных повторов (КТП) первичных фибробластов кожи пациентов (ФЧ) с семейными формами БАС и полученных линий иПСК

КТП-маркер	ФЧ1	иПСК1.2	ФЧ2	иПСК2.2
AMEL	X Y	X Y	X X	X X
CSF1PO	10 14	10 14	10 12	10 12
D10S1248	13 14	13 14	14 15	14 15
D12S391	16 23	16 23	20 23	20 23
D13S317	11 12	11 12	11 11	11 11
D16S539	12 12	12 12	11 13	11 13
D18S51	15 15	15 15	13 14	13 14
D1S1656	13 17.3	13 17.3	12 16.3	12 16.3
D22S1045	15 16	15 16	15 16	15 16
D2S441	10 13	10 13	11 14	11 14
D3S1358	15 16	15 16	17 18	17 18
D5S818	11 11	11 11	12 13	12 13
D7S820	9 11	9 11	10 12	10 12
D8S1179	13 14	13 14	14 15	14 15
FGA	21 23	21 23	21 21	21 21
SE33	16 30.2	16 30.2	26.2 26.2	26.2 26.2
TH01	9 9.3	9 9.3	6 9.3	6 9.3
TPOX	9 11	9 11	8 8	8 8
vWA	17 18	17 18	17 18	17 18

включая метилирование промоторных участков генов, экспрессирующихся в терминально дифференцированных клетках; активацию генов плюрипотентного состояния при гипометилировании промоторов; глобальные изменения хроматина и реактивацию X-хромосомы, замолкающей при развитии организма [17]. Начиная с 11 дня после введения репрессирующих генов происходило формирование компактных колоний, состоящих из активно делящихся клеток с увеличенным соотношением ядро/цитоплазма, по сравнению с изначальной культурой фибробластов (*рис. 1А,Б*). На основе морфологического сходства с ЭСК был проведен механический отбор индивидуальных колоний с целью создания стабильных линий иПСК (*рис. 1В*). При окраске на щелочную

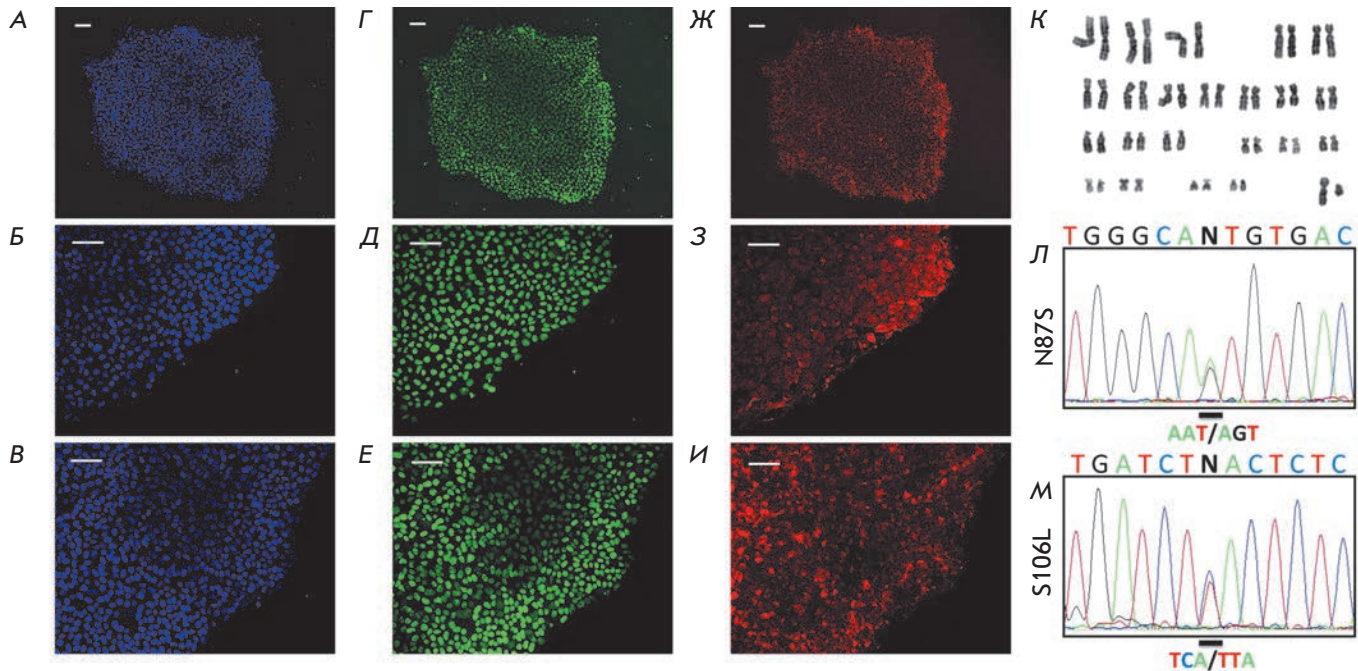


Рис. 2. Характеристика пациент-специфических линий иПСК. А–И – визуализация маркеров плюрипотентного состояния при иммуноцитохимическом окрашивании на транскрипционные факторы Oct3/4 (Г), Sox2 (Д), Nanog (Е) и поверхностные антигены SSEA-4 (Ж), TRA-1-60 (З), TRA-1-81 (И). Показано также окрашивание ядер клеток с помощью DAPI (А – В); К – кариотип линии иПСК, GTG-бэндинг; Л, М – результаты секвенирования, подтверждающие мутации в гене *SOD1*, в полученных иПСК

фосфатазу, активность которой возрастает в плюрипотентных клетках [23], мы обнаружили, что эффективность репрограммирования при использовании лентивирусной системы ($0.77 \pm 0.025\%$) в 10 раз выше, чем при использовании рекомбинантного вируса Сендай ($0.083 \pm 0.006\%$) (рис. 1Г,Д,Е). Кроме того, стабилизация плюрипотентного состояния в полученных с помощью вируса Сендай линиях иПСК, не содержащих трансгенов, происходила постепенно, в течение нескольких пассажей, что сопровождалось высоким процентом спонтанно дифференцированных клеток (данные не приведены). Тем не менее использование неинтеграционных методов позволяет получать генетически немодифицированные плюрипотентные клетки для каждого пациента, что важно в случае использования клеток как в заместительной терапии, так и при изучении патогенеза заболеваний, так как интеграция трансгенов в районы активного хроматина может привести к изменению экспрессии генов.

Характеристика пациент-специфических линий иПСК

Согласно результатам иммуноцитохимического окрашивания полученные линии иПСК экспрес-

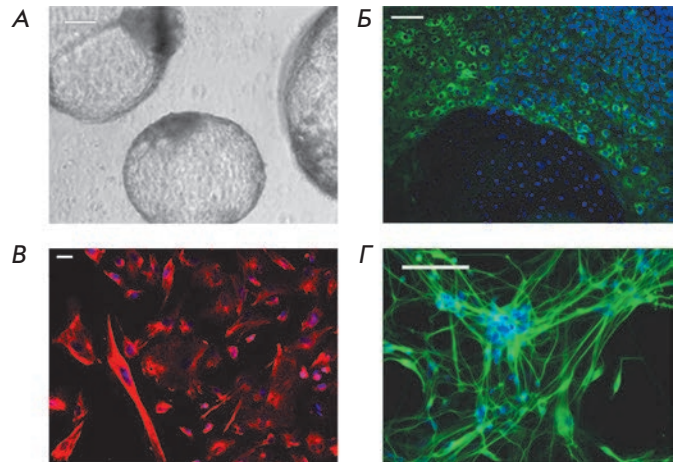


Рис. 3. Спонтанная дифференцировка иПСК в производные трех зародышевых листков. А – репрезентативная фотография эмбриоидных тел; Б, В, Г – иммуноцитохимическое окрашивание на α -фетопротейн (Б), виментин (В), β III-тубулин (Г). Ядра клеток окрашены DAPI (показано синим)

сируют специфические для ЭСК поверхностные антигены: SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, а также ядерные факторы транскрипции, ассоциированные с плюрипотентностью – Nanog, Oct4, Sox2 (рис. 2А–И). Анализ кариотипа линий иПСК методом GTG-бэндинга не выявил изменений в числе и структуре хромосом, возникших в процессе репрограммирования (рис. 2К). С целью определения способности иПСК к дифференцировке в производные трех зародышевых листков все анализируемые линии были помещены в суспензионную культуру, где образовывали трехмерные структуры – эмбриоидные тельца. После 14 дней культивирования эмбриоидные тельца переносили на покрытый желатином культуральный пластик для адгезии и последующей миграции клеток. Прикрепленные клетки обладали различной морфологией, и при иммуноцитохимическом окрашивании

были выявлены клеточные популяции, позитивные по βIII-тубулину (маркер эктодермы), виментину (маркер мезодермы) и α-фетопротейну (маркер энтодермы) (рис. 3).

Для подтверждения того, что полученные линии иПСК произошли именно из первичных фибробластов пациентов, мы проверили профили коротких tandemных повторов (КТП) этих линий клеток. Оказалось, что иПСК полностью совпадают с исходными линиями фибробластов по 18 КТП-маркерам (таблица). При этом в полученных линиях иПСК детектируется также генетическая причина БАС – мутация в гене *SOD1*, своя для каждого пациента (рис. 2Л,М).

Таким образом, по морфологическим признакам, экспрессии маркеров плюрипотентности, способности дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков линии иПСК, полу-

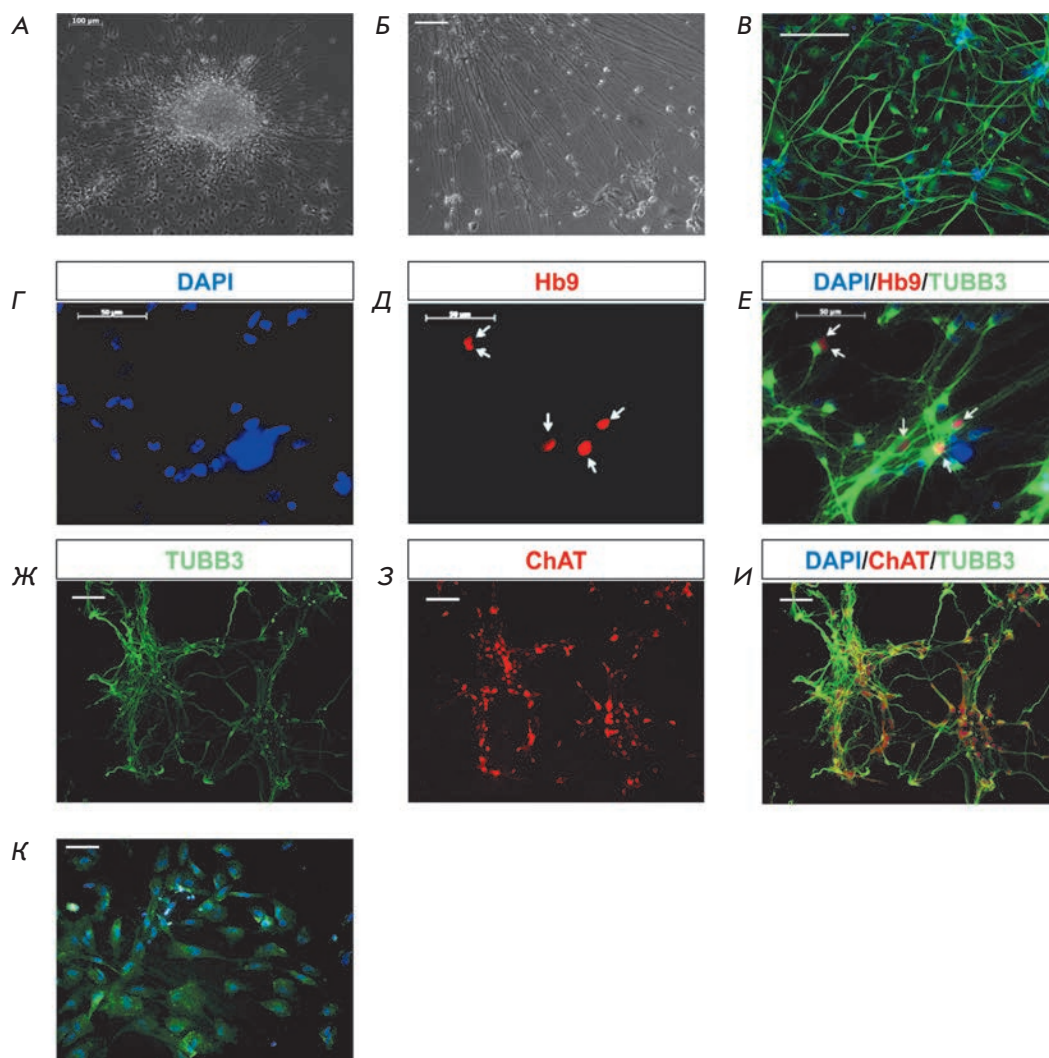


Рис. 4. Нейрональная дифференцировка пациент-специфических иПСК с мутациями в гене *SOD1*. А, Б – репрезентативные фотографии нейроподобных клеток при дифференцировке иПСК; В – иммуноцитохимическое окрашивание на общий нейрональный маркер βIII-тубулин (TUBB3); Г–И – визуализация маркеров моторных нейронов Hb9 (Д, Е) и ChAT (З, И); К – детекция белка GFAP при дифференцировке иПСК в астроциты. Ядра клеток окрашены DAPI (показано синим)

ченные из фибробластов кожи пациентов с SOD1-ассоциированным БАС, являются плюрипотентными.

Получение моторных нейронов из иПСК с мутациями в гене *SOD1*

Как показано ранее, гибель моторных нейронов при БАС может быть не автономным клеточным процессом, а зависеть от клеток микроокружения [7, 14]. Поэтому нашей дальнейшей задачей стала разработка протоколов дифференцировки иПСК в моторные нейроны и астроциты. Ранее в экспериментах *in vivo* было показано, что при развитии организма моторные нейроны формируются в результате воздействия на нейрональные прогениторные клетки двух последовательных сигналов: ретиноевой кислоты (каудализация) и Sonic hedgehog (вентрализация) [24]. Нейрональные предшественники были получены из суспензионных эмбрионидных телес с помощью ингибирования сигнального пути SMAD. Направленную дифференцировку в моторные нейроны проводили через 12 дней, добавляя в культуральную среду ретиноевую кислоту и рекомбинантный белок Sonic hedgehog. После диссоциации нейросфер до единичных клеток нейрональные предшественники переносили на чашки Петри, покрытые матригелем, и культивировали как прикрепленную культуру. Эти клетки экспрессируют общий нейрональный маркер βIII-тубулин, что доказывает нейрональное происхождение полученной популяции клеток (рис. 4А–В). На последнем этапе под воздействием нейроспецифических факторов роста BDNF и GDNF происходило созревание моторных нейронов. Иммунохимический анализ показал, что в полученных культурах βIII-тубулин-позитивные нейроны коэкспрессировали такие маркеры, как Hb9 (или MNX1;

транскрипционный фактор, специфичный для моторных нейронов) и ChAT (холин-ацетилтрансфераза) (рис. 4Г–И). Таким образом, полученные линии пациент-специфических иПСК способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны, гибель которых происходит при БАС.

Кроме того, при дифференцировке линий иПСК в астроглиальном направлении мы идентифицировали клетки, экспрессирующие GFAP – основной маркер астроцитов (рис. 4К), токсический эффект которых показан при патологии БАС.

Таким образом, получены пациент-специфические линии иПСК, которые имеют преимущество перед другими опубликованными моделями [25], так как генетически идентичны изначальным клеткам пациентов и потенциально позволяют наиболее точно воспроизвести молекулярные события при развитии БАС. Кроме того, культивирование полученных линий иПСК в определенных, заданных условиях (среда mTeSR1) позволяет поддерживать плюрипотентное состояние клеток для стабильного и неограниченного получения моторных нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе получены иПСК для пациентов с SOD1-ассоциированным боковым амиотрофическим склерозом. Показано, что эффективность репрограммирования при использовании лентивирусной системы доставки генов в 10 раз выше, чем при использовании рекомбинантного вируса Сендай. Эти линии иПСК с мутациями в гене *SOD1* плюрипотентны и способны к направленной дифференцировке в моторные нейроны. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-32018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. P. 1105–1116.
- 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. P. 1604–1609.
- Bruijn L.I., Becher M.W., Lee M.K., Anderson K.L., Jenkins N.A., Copeland N.G., Sisodia S.S., Rothstein J.D., Borchelt D.R., Price D.L., et al. // *Neuron*. 1997. V. 18. P. 327–338.
- Jonsson P.A., Ernhill K., Andersen P.M., Bergemalm D., Brannstrom T., Gredal O., Nilsson P., Marklund S.L. // *Brain*. 2004. V. 127. P. 73–88.
- Frey D., Schneider C., Xu L., Borg J., Spooren W., Caroni P. // *J. Neurosci*. 2000. V. 20. P. 2534–2542.
- Liu J., Lillo C., Jonsson P.A., Vande Velde C., Ward C.M., Miller T.M., Subramaniam J.R., Rothstein J.D., Marklund S., Andersen P.M., et al. // *Neuron*. 2004. V. 43. P. 5–17.
- Boillee S., Yamanaka K., Lobsiger C.S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kassiotis G., Kollias G., Cleveland D.W. // *Science*. 2006. V. 312. P. 1389–1392.
- Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.R., Wilcox H.M., Flood D.G., Beal M.F., Brown R.H. Jr., et al. // *Nat. Genet*. 1996. V. 13. P. 43–47.
- Subramaniam J.R., Lyons W.E., Liu J., Bartnikas T.B., Rothstein J., Price D.L., Cleveland D.W., Gitlin J.D., Wong P.C. // *Nat. Neurosci*. 2002. V. 5. № 4. P. 301–307.
- 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. P. 2753–2764.
- Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P., Rouleau G.A. // *Ann. Neurol*. 2007. V. 62. № 6. P. 553–559.
- Guzman A., Wood W.L., Alpert E., Prasad M.D., Miller R.G., Rothstein J.D., Bowser R., Hamilton R., Wood T.D., Cleveland D.W., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 12524–12529.
- Pramatarova A., Laganieri J., Roussel J., Brisebois K., Rouleau G.A. // *J. Neurosci*. 2001. V. 21. P. 3369–3374.

14. Nagai M., Re D.B., Nagata T., Chalazonitis A., Jessell T.M., Wichterle H., Przedborski S. // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. P. 615–622.
15. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell.* 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
16. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. № 2. P. 91–92.
17. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 937–946.
18. Shutova M.V., Chestkov I.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Springer Protocols Handbook ser.* 2012. P. 133–149.
19. 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. 145.
20. Krencik R., Zhang S.C. // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. № 11. P. 1710–1717.
21. Shi Y., Desponts C., Do J.T., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
22. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
23. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creighton M.P., Steine E.J., Cassady J. P., Foreman R., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. № 2. P. 250–264.
24. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A., Jessell T.M. // *Cell.* 2002. V. 110. № 3. P. 385–397.
25. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science.* 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.