

УДК 577.29

ПЛАТФОРМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ

© 2019 Е.И. Устьянцева^{1,2,3,4}, С.П. Медведев^{1,2,3,4}, А.С. Ветчинова⁵,
Ю.М. Минина¹, С.Н. Иллариошкин⁵, С.М. Закиян^{1,2,3,4*}

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,
Россия; электронная почта: Zakian@bionet.nsc.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. ак. Е.Н. Мешалкина,
Минздрава России, 630055 Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

⁵ Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.10.2018

После доработки 11.11.2018

Принята к публикации 11.11.2018

Пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют собой перспективный источник для исследований патологических процессов и поиска методов их коррекции, поскольку они способны к направленной дифференцировке в клетки релевантного типа. Однако в настоящий момент не существует общепринятых стратегий использования клеточных линий в исследовании заболеваний. Генетически-кодируемые биосенсоры в режиме реального времени дают возможность регистрировать активность ферментов, сигналы от специфических молекул и метаболитов и выражать эти показатели количественно. Такой подход позволяет измерить вклад определенных молекул в развитие патологии. В представленной работе описан процесс разработки универсальной клеточной платформы, предназначенной для изучения отдельных патологических процессов, характерных для нейродегенерации при боковом амиотрофическом склерозе. Созданы конструкции, необходимые для встраивания в геном клеток генетически кодируемых биосенсоров, с помощью которых можно исследовать различные процессы: стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), окислительный стресс, апоптоз и Ca^{2+} -зависимую гипервозбудимость. Кроме того, получена пара трансгенных линий ИПСК: с мутацией в гене *SOD1* и условно здоровая контрольная линия, которые несут встроенный трансактиватор для доксициклин-управляемой экспрессии трансгенов и могут быть использованы для встраивания большого количества различных биосенсорных конструкций за один шаг.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: индуцируемые плюрипотентные стволовые клетки, биосенсоры, CRISPR/Cas9.

DOI: 10.1134/S0320972519030126

Феномен индуцированной плюрипотентности был открыт относительно недавно — в 2006 г., когда была опубликована работа, авторы кото-

рой описали получение плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов взрослой мыши путем эктопической экспрессии четырех генов:

Принятые сокращения: ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭПР — эндоплазматический ретикулум; БАС — боковой амиотрофический склероз; SOD1 — супероксиддисмутаза 1 (superoxide dismutase 1); ПЦР — полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; CRISPR/Cas9 — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9); PBS — фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline); KLF4 — Круппель-подобный фактор 4 (Kruppel like factor 4); GDF3 — фактор роста и дифференцировки 3 (growth differentiation factor 3); TDGF1 — фактор роста, полученный из тератоканциномы (teratocarcinoma-derived growth factor 1); DNMT3B — ДНК-метилтрансфераза β (DNA methyltransferase 3 beta); hTERT — обратная транскриптаза теломеразы (telomerase reverse transcriptase); PODXL — подокаликсин-подобный белок (podocalyxin like); GAPDH — глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); SSEA4 — стадийспецифичный эмбриональный антиген 4 (stage-specific embryonic antigen 4); PAX6 — ген окулоромбина (paired box 6); MAP2 — белок, ассоциированный с микротрубочками (microtubule associated protein 2); FOXA2 — forkhead box A2, AFP — альфа-фетопроtein (alpha fetoprotein); GFP — зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); RFP — красный флуоресцентный белок (red fluorescent protein).

* Адресат для корреспонденции.

Oct4, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* [1]. Такие клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). ИПСК человека были получены годом позже [2] и сразу привлекли к себе внимание в качестве системы для изучения физиологических и патологических процессов ввиду способности к самообновлению и широкого спектра дифференцировки. Возможность получения ИПСК из соматических клеток человека открыла новый путь для изучения различных патологических состояний, чаще всего обусловленных генетическими мутациями.

С момента получения первых ИПСК человека был разработан ряд моделей заболеваний на основе пациент-специфичных ИПСК [3, 4]. Большинство из них – моногенные наследственные заболевания, хотя имеются и модели спорадических мультифакторных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [5]. Важно отметить, что в большинстве случаев полученные из ИПСК специфические типы клеток воспроизводили патологический фенотип, доказывая лишний раз адекватность подобных модельных систем [6–9].

Особый интерес представляет использование ИПСК для исследования нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся неясной этиологией, сложным патогенезом и, как следствие, отсутствием эффективных препаратов, предотвращающих гибель специфических нейронов. К таким заболеваниям относится боковой амиотрофический склероз (БАС), который морфологически характеризуется гибелью центрального и периферического моторных нейронов [10]. Клинически на первый план выходит прогрессирующий паралич скелетной мускулатуры и диафрагмы, что делает дыхательную недостаточность основной причиной смерти больных [11]. Однако по совокупности клинических особенностей, начиная от возраста манифестации и скорости прогрессии симптомов и заканчивая наличием/отсутствием когнитивных нарушений, БАС является одним из самых гетерогенных среди нейродегенеративных заболеваний. На настоящий момент нет ясности как в вопросах этиологии БАС, так и в механизмах патогенеза заболевания [12–14]. До 10% случаев БАС имеют доказанный наследственный характер, причем список генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания, составляет >100 наименований [15]. Продукты этих генов чаще всего связаны с обеспечением базовых клеточных процессов, таких как метаболизм белков, РНК, внутриклеточный транспорт, механизмы защиты клеток от активных форм кислорода [16, 17].

Исследования БАС на животных модельных системах во многом помогли понять картину системных нарушений, которые развиваются в процессе дегенерации моторных нейронов, однако они не позволяют исследовать патологические изменения нервной системы в режиме реального времени, от инициации до ранних, а затем и поздних стадий заболевания [18, 19]. Технологии получения ИПСК от больных БАС, совершенствование протоколов по направленной дифференцировке в моторные нейроны позволили разработать модельную систему для изучения патологических особенностей нейронов пациентов. Но большинство работ по изучению клеточных моделей ограничивается исследованием профилей экспрессии генов с последующим поиском возможных ассоциаций [9] или изучением определенных метаболических процессов [20, 21], что также не способствует установлению причинно-следственных связей между процессами, приводящими к гибели моторных нейронов.

Генетически кодируемые биологические сенсоры представляют собой известные инструменты для изучения биологических процессов. Они позволяют в режиме реального времени регистрировать сигнальные молекулы, метаболиты и активность ферментов в живых системах различной сложности: от культивируемых клеток до трансгенных животных [22, 23]. В качестве непосредственного сенсора обычно выступает белок, способный претерпевать конформационные изменения в ответ на определенные стимулы [24], приводящие к появлению репортерного сигнала: электрохимического, люминесцентного или флуоресцентного, который может быть выражен количественно. На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически кодируемые биосенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций в живых системах [25, 26]. Такие биосенсоры позволяют измерять активность основных патологических процессов, сопровождающих гибель нейронов: апоптоз, окислительный стресс, стресс ЭПР, гипервозбудимость, и активно применяются для их исследования на моделях других заболеваний [27–29].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструкция плазмиды, кодирующей компоненты CRISPR/Cas9. Плазмида, кодирующая компоненты системы Cas9 и направляющую РНК для внесения двунитевого разрыва в локусе *AAVS1* (pX458-AAVS1), была сконструирована на основе pSpCas9(BB)-2A-GFP («Addgene» #48138, [30]). Для этого фрагмент, полученный

путем отжига олигонуклеотидов sgAAVS1-F и sgAAVS1-R (табл. 1), был встроен в вектор по сайтам рестрикции BbsI.

Сборка плазмид-доноров для встраивания биологических сенсоров в геном. Сборку донорных плазмид осуществляли путем последовательно гидролиза плазмидных векторов эндонуклеазами рестрикции и лигирования фрагментов, полученных с помощью ПЦР-амплификации участков плазмид, последовательности которых находятся в открытом доступе (табл. 1).

В плазмиду pBluescript SK(+) по сайтам Acc65I и SpeI клонировали двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий сайты AflII и MluI, который был получен ранее при отжиге двух одноцепочечных олигонуклеотидов: HM-MCS-U и HM-MCS-L (табл. 1). В результате была создана плаزمид pBluescript SK(+) MCS, в которую по сайтам SpeI и MluI встроили фрагмент HA-R-CMV. Затем между сайтами MluI и AflII в полученную плазмиду, поместили фрагмент Cas9-HF1. Сигнал полиаденилирования bGHpolyA изменили на SV40poly(A) посредством замены соответствующего фрагмента, ограниченного сайтами AgeI и AflII. На финальной стадии в полученную конструкцию между сайтами Acc65I и AflII поместили фрагмент HA-L-Puro.

Последующие плазмиды конструировали на основе полученного вектора pSpCas9-HF1-donor посредством замены фрагмента плазмиды между сайтами рестрикции MluI и AgeI/AflII.

Для создания плазмиды pXBP1-TagRFP-ERSS получили фрагмент XBP1, который клонировали в вектор pGEM-T Easy («Promega», США). Плазмидный вектор pGEM-T Easy_XBP1 использовали в качестве матрицы для амплификации фрагментов XBP1 Δ DBD, XBP1_indel, которые затем поместили между сайтами NheI и Acc65I в вектор pсDNA 3.1/Hygro (-). Между сайтами Acc65I и AflII полученного вектора встроили фрагмент tagRFP. Итоговую плазмиду использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации фрагментов XBP1-tagRFP, XBP1-tagRFP_indel, которые впоследствии были вставлены в вектор pSpCas9-HF1-donor по сайтам рестрикции MluI и AgeI.

Для создания плазмид pCyto-Grx1-roGFP2-donor и pMito-Grx1-roGFP2-donor с помощью ПЦР получили фрагменты Cyto-Grx1-roGFP2 и Mito-Grx1-roGFP2 соответственно, которые затем клонировали в вектор pSpCas9-HF1-donor по сайтам рестрикции MluI и AgeI. Донорные плазмиды pCyto-roGFP2-Orp1-donor и pMito-roGFP2-Orp1-donor были сконструированы путем встраивания фрагментов Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 по сайтам рестрикции MluI и AgeI в вектор pSpCas9-HF1-donor.

Донорные плазмиды pCasper3-BG-donor и pCasper3-GR-donor были получены с помощью встраивания фрагментов Casper3-BG и Casper3-GR в pSpCas9-HF1-donor по сайтам рестрикции MluI и AflII.

Для создания плазмид pAAVS-TRE-CMV-GCaMP6f/m/s фрагменты GCaMP6f, GCaMP6m и GCaMP6s, полученные с помощью ПЦР, встраивали в вектор pSpCas9-HF1-donor по сайтам рестрикции MluI и AgeI.

Все плазмиды нарабатывали в штамме-продукте *E. coli* XL10-GOLD Kan^r («Agilent», США). Выращивание трансформированных бактерий осуществляли при 30 °С. Для проведения ПЦР во всех случаях использовали высокоточные ДНК-полимеразы Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase («New England Biolabs», США) или Phusion[™] Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Fisher Scientific», США). Для клонирования фрагментов применяли эндонуклеазы рестрикции производства «New England Biolabs» (США), «Promega» (США) и «СибЭнзим» (Россия), а также T4 ДНК-лигазу («Thermo Fisher Scientific», США). Правильность сборки конструкций проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования методом Сенгера.

Размораживание, культивирование и репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови к плюрипотентному состоянию. Мононуклеарные клетки крови больного наследственной формой БАС (мутация D90A в гене *SOD1*) были получены от пациента коллегами из ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва, Россия) методом центрифугирования в градиенте фикола (1,077 г/мл; «Биолот», Россия). Мононуклеары размораживали за пять дней до перепрограммирования и культивировали в ростовой среде известного состава [31]. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и влажности 90%.

Мононуклеары были перепрограммированы к плюрипотентному состоянию посредством трансформации набором эписомных векторов (pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD, pCE-GFP, pCXB-EBNA-1 («Addgene» #41855-58, #41813-14)) методом электропорации на приборе Neon Transfection System («Thermo Fisher Scientific», США), согласно опубликованному ранее протоколу [32]. Первичные колонии ИПСК механически пересаживали на слой эмбриональных фибро-бластов мыши (фидер) или искусственный матрикс Matrigel («Corning», США) на 20–30-й день перепрограммирования. Для культивирования на фидере использовали ростовую среду известного состава [33], на искусственном матриксе – ростовую среду E8 («Thermo Fisher Scientific», США).

Таблица 1. Фрагменты, использованные для конструкции донорных плазмид

Название	Содержимое фрагмента	Источник и праймеры для ПЦР, 5'–3'
1	2	3
sgAAVS1-F	–	CACCGGTCACCAATCCTGTCCCTAG
sgAAVS1-R	–	AAACCTAGGGACAGGATTGGTGACC
HM-MCS-U	полилинкер	CGGCGCGCCCTTAAGGTTAACACGCGTGGCGCGCCA
HM-MCS-L	полилинкер	CTAGTGGCGCGCCACGCGTGTAAACCTTAAGGGCGC-GCCGGTAC
HA-R-CMV	правое плечо гомологии к локусу <i>AAVS1</i> (HA-R), промотор TRE-minCMV	Puro-Cas9 donor («Addgene» #58409, [38]), ACGCGTGGCGATCTGACGGTTCACCT, ACTAGTAGAGCAGAGCCAGGAACC
Cas9-HF1	SpCas9-HF1, SV40 NLS, эпитоп 3xFLAG, bGHpoly(A)	VP12 («Addgene» #72247, [39]), ACGCGTGCCACCATGGATAAAAAG, CTTAAGCCATAGAGCCCACCGCA
SV40poly(A)	SV40poly(A)	pcDNA 3.1/Hygro (–), GCAACCGGTACGAGATTTTCGATTCCACCG, CAGCTTAAGTAAGATACATTGATGAGTTTG
HA-L-Puro	левое плечо гомологии к локусу <i>AAVS1</i> (HA-L), ген устойчивости к пурамицину с сайтом полиаденилирования bGHpoly(A)	Puro-Cas9 donor («Addgene» #58409, [38]), GGTACCTGCTTTCTCTGACCAGCAT, CTTAAGCCATAGAGCCCACCGCAT
XBP1	фрагмент XBP1, содержащий стресс-чувствительный интрон	кДНК, полученная методом ОТ-ПЦР с использованием РНК из тканей головного мозга человека, GCGCGGTGCGTAGTCTGGAGC, GGTATATATGTGGTCAAAAACG
XBP1ΔDBD, XBP1_indel	сплайсированный и несплайсированный варианты XBP1	pGEM-T-Easy_XBP1, CAAGCTAGCGCCACCATGGACTA-CAAAGACGATGACGACAAGGAGAAAACATGGCCTTG-TAGTTGAG, AATGGTACCCCTAAGTCAATACCGCCAGAATCC
TagRFP	TagRFP без старт-кодона	pTagRFP-N («Евроген», Россия), GTCGGTACCGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTG, GCGCTTAAGTTAATTAAGCTTGTGCCCCA
XBP1-TagRFP, XBP1-TagRFP_indel	XBP1, TagRFP	pCMV-XBP1-TagRFP, pCMV-XBP1-TagRFP_indel, CTGACGCGTGCCACCATGGACTACAAAG, CGCACCGGTTCAATTAAGTTTGTGCCCCA
Cyto-Grx1-roGFP2	Grx1-roGFP2	pLPCX cyto Grx1-roGFP2 («Addgene» #64975 [22]), ACCACGCGTGCCACCATGGCTCAAGAGTTTGTGAAC, TTTACCGGTTTACTTGTACAGCTCGTCC
Mito-Grx1-roGFP2	Grx1-roGFP2, сигнальная последовательность (субъединица АТФ-синтазы 9)	pLPCX mito Grx1-roGFP2 («Addgene» #64977, [22]), GACACGCGTGCCACCATGGCTCCACTCGTGTCCCTC, TTTACCGGTTTACTTGTACAGCTCGTCC
Cyto-roGFP2-Orp1	roGFP2-Orp1	pLPCX roGFP2-Orp1 («Addgene» #64991, [40]), GACACGCGTGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG, TTTACCGGTCTATTCCACCTCTTTCAAAAAG
Mito-roGFP2-Orp1	roGFP2-Orp1, сигнальная последовательность (субъединица АТФ-синтазы 9)	pLPCX mito roGFP2-Orp1 («Addgene» #64992, [40]), GACACGCGTGCCACCATGGCTCCACTCGTGTCC, TTTACCGGTCTATTCCACCTCTTTCAAAAAG

Окончание табл. 1

1	2	3
Casper3-BG	BFP, tagGFP2, сайт гидролиза каспазой 3	pCasper3-BG («Евроген», Россия), CCAACGCGTGCCACCATGAGCGAGCTGAT, CGCCTTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC
Casper3-GR	tagGFP2, RFP, сайт гидролиза каспазой 3	pCasper3-GR («Евроген», Россия), CCAACGCGTGCCACCATGGTGAGCGAGCT, CGCCTTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC
GCaMP6f	кальмодулин_fast, GFP, кальмодулин-связывающий пептид	pAAV.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 («Addgene» #100837, [29]), GATACGCGTGCCACCATGGGTTCTCATCATC, GATACCGGTTCACTTCGCTGTTCATCATTTGTAC
GCaMP6m	кальмодулин_medium, GFP, кальмодулин-связывающий пептид	pAAV.Syn.GCaMP6m.WPRE.SV40 («Addgene» #100841, [29]), GATACGCGTGCCACCATGGGTTCTCATCATC, GATACCGGTTCACTTCGCTGTTCATCATTTGTAC
GCaMP6s	кальмодулин_slow, GFP, кальмодулин-связывающий пептид	pAAV.Syn.GCaMP6s.WPRE.SV40 («Addgene» #100843, [29]), GATACGCGTGCCACCATGGGTTCTCATCATC, GATACCGGTTCACTTCGCTGTTCATCATTTGTAC

Спонтанная дифференцировка *in vitro*. Для спонтанной дифференцировки клетки наращивали до 85–90%-ной конfluence, диссоциировали от поверхности культуральной емкости, инкубируя с коллагеназой IV типа («Sigma-Aldrich», США) в течение 20–30 мин при 37 °С. Затем полученные агрегаты клеток аккуратно переносили в культуральную емкость, покрытую слоем 1%-ной агарозы, для предотвращения прикрепления клеток и образования эмбрионных телец (ЭТ). Клетки культивировали в виде эмбрионных телец (ЭТ) в среде без основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) в течение двух недель, после чего распластывали на поверхности культуральных планшетов, покрытых желатином, и культивировали еще две недели.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в течение 10 мин, затем отмывали PBS 2 раза по 15 мин. Пермеабиллизацию проводили при комнатной температуре с помощью 0,5%-ного раствора Triton X-100 в течение 30 мин, затем снова дважды отмывали PBS по 15 мин. Далее лунки с клетками инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин с блокирующим буфером (раствор бычьего сывороточного альбумина в PBS, 10 мг/мл). Инкубацию с первичными антителами проводили при 4 °С в течение ночи, со вторичными антителами – при комнатной температуре 1,5–2 ч. После инкубации с первичными и вторичными антителами препараты клеток дважды по 15 мин отмывали

от несвязавшихся антител PBS при комнатной температуре. Для окрашивания ядер препаратов использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1 мкг/мл в PBS. Анализ препаратов производили на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E («Nikon», Япония).

Выделение РНК, синтез кДНК и ОТ-ПЦР. РНК из клеток выделяли с помощью TRIzol reagent («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу производителя. Для очистки образцов РНК от контаминации геномной ДНК использовали набор реагентов DNA-free («Ambion», США). Полученную РНК хранили при –70 °С и использовали для синтеза кДНК методом обратной транскрипции с помощью набора SuperScript II («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу производителя. ОТ-ПЦР на выявление экспрессии маркеров плюрипотентности и тканеспецифичных маркеров проводили, используя праймеры и условия реакции, описанные ранее [1].

Анализ кариотипа. Анализ кариотипа полученных линий ИПСК проводили, как описано ранее [34].

Электрорастворение ИПСК. Для ИПСК, растущих на слое фидера, первоначально осуществляли перевод клеточной культуры на искусственный матрикс. За 24 ч до трансфекции клетки пересаживали на новый матрикс в соотношении 1 : 3...1 : 4. В день трансфекции клетки снимали диссоциирующим реагентом TrypLE («Thermo Fisher Scientific», США), ресуспендировали до одноклеточного состояния в PBS, центрифугировали в течение 5 мин при 200 г. Из расчета

конечной концентрации $0,5 \times 10^7$ клеток/мл их ресуспендировали в буфере R (Neon Transfection System 100ul Kit, «Thermo Fisher Scientific», США), добавляли 2 мкг рХ458-AAVS1 и 3 мкг AAVS-Neo-M2rtTA («Addgene» #60843, [35]). Электропорацию проводили в 100 мкл при следующих параметрах электрического импульса: 1100 V, 30 мс, 1 импульс. После электропорации клетки переносили в подготовленные культуральные планшеты с подогретой ростовой средой, содержащей 10 нг/мл ингибитора Rho-ассоциированной протеинкиназы (Y-27632, «Sigma-Aldrich», США). Среду меняли через 4 ч после электропорации на свежую с добавлением Y-27632.

Отбор субклонов ИПСК на селективной среде.

Для поиска желаемых вставок проводили культивирование ИПСК на селективной среде, содержащей антибиотик – сульфат неомицина («Thermo Fisher Scientific», США). Концентрацию антибиотика подбирали для каждой линии клеток методом титрования. Селекцию проводили в течение 5 дней. Через 24–48 ч после отмены антибиотика проводили механическое выделение устойчивых колоний ИПСК с их последующим переносом в отдельные лунки культуральных планшетов для культивирования и анализа.

Анализ субклонов и отбор субклонов, содержащих целевую вставку. Выделение геномной ДНК из клеток осуществляли с помощью реагента Quick Extract DNA Extraction Solution («Epicentre», США) по протоколу производителя, и выделенную ДНК хранили при -20°C . ПЦР проводили с реагентом БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) («Биолабмикс», Россия). Для выявления клонов

клеток, в которых произошла CRISPR-опосредованная вставка трансгена в целевой сайт, были использованы праймеры, представленные в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание донорных плазмид, кодирующих последовательности биосенсоров. В результате работы был создан ряд плазмидных донорных векторов, предназначенных для встраивания последовательностей биосенсоров в локус *AAVS1*: рХBP1-TagRFP-ERSS, рCyto-Grx1-roGFP2-donor, рMito-Grx1-roGFP2-donor, рCyto-roGFP2-Orp1-donor, рMito-roGFP2-Orp1-donor, рCasper3-BG-donor, рCasper3-GR-donor, рAAVS-TRE-CMV-GCaMP6f/m/s. Каждый биосенсор содержит плечи гомологии к локусу *AAVS1*, необходимые для встраивания конструкции посредством гомологичной рекомбинации (табл. 3).

Перепрограммирование пациент-специфичных мононуклеарных клеток крови и характеристика ИПСК. В течение первых четырех недель после электропорации мононуклеарных клеток периферической крови было получено 13 первичных колоний ИПСК: две – в условиях xeno-free (в отсутствие биологических компонентов животного происхождения, в среде с химически определенным составом), 11 – на слое фидера. Клетки полученных линий ИПСК отличались характерной для плюрипотентных клеток высокой скоростью пролиферации, большим ядерно-цитоплазматическим соотношением и морфологией колоний, схожей с морфологией эмбриональ-

Таблица 2. Праймеры для идентификации встраивания

Праймер	Последовательность (5'–3')	Комментарий
AAVS1_WT-F	CTCTGGCTCCATCGTAAGCAA	длина продукта – 555 п.н.
AAVS1_WT-R	CCCAAAGTACCCCGTCTCCC	амплификация аллеля дикого типа, без целевой вставки
HA_L-OUT	CCGGACCACTTTGAGCTCTAC	отжиг вне плеча гомологии, необходим для определения правильности позиции вставки
Neo_in-R	GCCCAGTCATAGCCGAATAG	+ HA_L-OUT, длина продукта – 1042 п.н., определение позиции вставки + HA_L-F1, длина продукта – 461 п.н., определение наличия вставки
HA_L-F1	CTGTGGATTCGGGTACCTC	отжиг внутри плеча гомологии
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	+Neo_in-R, длина продукта – 1063 п.н., определение наличия дополнительных нецелевых вставок плазмиды в геном

Таблица 3. Генетически-кодируемые биосенсоры и сфера их применения

Название	Мишень	Область исследований
pXBP1-TagRFP-ERSS	XBP1 – индикатор стресса ЭПР	нейродегенеративные заболевания [28], болезнь Крона [27]
pCyto-Grx1-roGFP2-donor, pMito-Grx1-roGFP2-donor	roGFP2-Grx1 – сенсор окислительного потенциала глутатиона	онкологические заболевания, диабет [36]
pCyto-roGFP2-Orp1-donor, pMito-roGFP2-Orp1-donor	roGFP2-Orp1 – сенсор окислительной активности H ₂ O ₂	хронические воспалительные заболевания [37]
pCasper3-BG-donor, pCasper3-GR-donor	каспаза 3 – эффекторный белок апоптоза	роль апоптоза в дегенеративных заболеваниях
pAAVS-TRE-CMV-GCaMP6f/m/s	Ca ²⁺ -зависимая гипервозбудимость	исследование возбудимости специфических типов клеток, в т.ч. нейронов [29]

ных стволовых клеток, экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу и основные маркеры плюрипотентных клеток (рис. 1, а). При спонтанной дифференцировке полученных клеток образуются производные трех зародышевых листков (рис. 1, б). Таким образом, было показано, что ИПСК являются плюрипотентными по статусу экспрессии основных маркеров плюрипотентности, а также способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке *in vitro*. Анализ кариотипа полученных линий на 10-м пассаже показал отсутствие хромосомных перестроек (рис. 1, в). Клетки сохраняют особенности генотипа донора, содержат однонуклеотидную замену в четвертом экзоне гена *SOD1*, которая приводит к замене Asp на Ala в 90-й позиции (рис. 1, г).

Внесение последовательности трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии в локус *AAVS1* при помощи CRISPR/Cas9. В локус *AAVS1* пациент-специфичных ИПСК (линия 1M_iALS) и условно здоровых контрольных ИПСК (линия iMA_1L) при помощи CRISPR/Cas9 была встроена последовательность трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии. В результате трансфекции каждой линии ИПСК с последующей селекцией было получено 23–32 субклонов, которые были проанализированы на наличие встроенного трансактиватора и корректность его положения в сайте *AAVS1*. Все полученные субклоны содержали вставку в целевом сайте. Однако для того, чтобы полученные линии были пригодны для встраивания последовательностей биосенсоров, протоспейсер для CRISPR/Cas9 в локусе *AAVS1* на гомологичной хромосоме должен быть неизменным. Секвенирование участка локуса *AAVS1*, содержавшего протоспейсер, показало, что шесть субклонов линии 1M_iALS и семь субкло-

нов линии iMA_1L имеют интактный протоспейсер в сайте *AAVS1* на гомологичной хромосоме.

Поиск дополнительных нецелевых вставок донорной плазмиды в геном. Поскольку плазмиды имеют склонность к случайной интеграции в геном, необходимо было удостовериться, что полученные субклоны не имеют дополнительных вставок донорной плазмиды, которые потенциально могут оказывать влияние на проявление фенотипических признаков патологии в пациент-специфичных ИПСК/контрольных ИПСК. Была подобрана пара праймеров для ПЦР-амплификации неинтегрирующегося участка донорной плазмиды. В результате анализа было обнаружено, что субклоны sc 4, sc 11, sc 3.2, sc 6.2 линии iMA_1L и sc 7, sc 12, sc 16, sc 27 линии 1M_iALS имеют дополнительные вставки в геном, а субклоны sc 17, sc 19.2, sc 24.2 линии iMA_1L и sc 2, sc 17 линии 1M_iALS – нет (рис. 2, а и б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее на различных модельных системах было показано, что стресс ЭПР, окислительный стресс, апоптоз и гипервозбудимость нейронов играют основную роль в патофизиологии БАС. Тем не менее выявить вклад каждого из компонентов в инициацию и развитие заболевания не представлялось возможным вследствие отсутствия подходящих методов для исследования. В данной работе были получены конструкции, которые кодируют биосенсоры, предназначенные для детекции патологических процессов в живых клетках (табл. 3). Представленный способ создания плазмидных векторов универсален, и на его основе можно создавать биосенсоры других клеточных процессов (рис. 3, а). Последова-

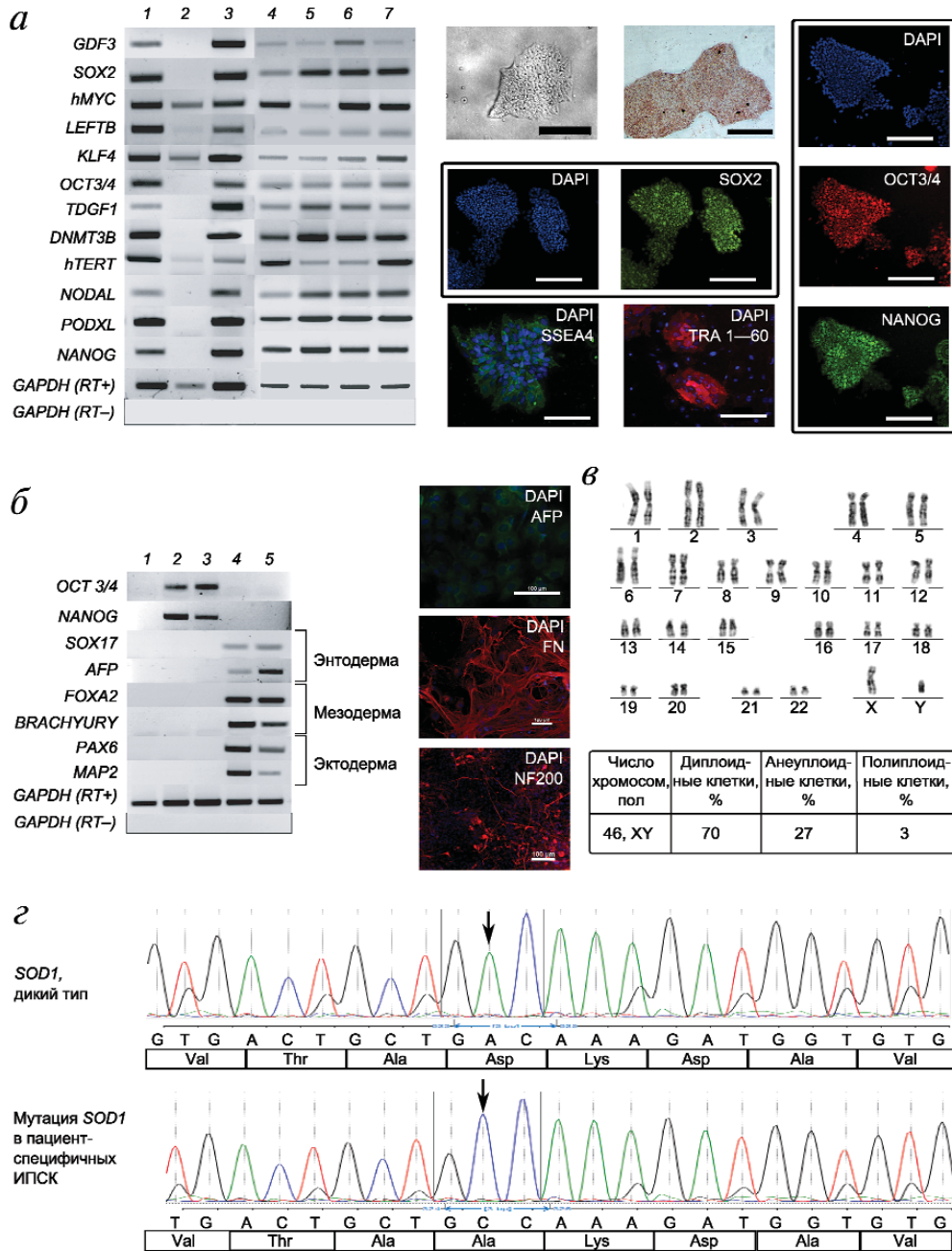


Рис. 1. Характеристика полученных пациент-специфичных линий ИПСК. *а* – Слева – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов – маркеров плюрипотентности в пяти линиях ИПСК: 1 – положительный контроль (кДНК эмбриональных стволовых клеток линии HUES9); 2 – отрицательный контроль (кДНК мононуклеарных клеток крови); 3–7 – линии ИПСК: 1M_iALS, 2g_iALS, 1g_iALS, 2M_iALS, 3M_iALS соответственно. Показано наличие экспрессии генов транскрипционных факторов: *SOX2*, *hMYC*, *KLF4*, *OCT 3/4*, *NANOG*, и различных регуляторных белков: *GDF3*, *LEFTB*, *TDGF1*, *DNMT3B*, *hTERT*, *NODAL*, *PODXL*. *GAPDH (RT+)* – положительный контроль реакции обратной транскрипции, *GAPDH (RT-)* – контроль на наличие контаминации геномной ДНК; справа – морфология колоний ИПСК, экспрессия эндогенной щелочной фосфатазы, иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов *SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG* и поверхностным антигенам *SSEA4* и *TRA-1-60* (линия 1M_iALS). Ядра окрашены DAPI. Увеличение $\times 10$, масштабная линейка – 250 мкм; *б* – спонтанная дифференцировка *in vitro*. ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов – маркеров производных эктодермы (*PAX6*, *MAP2*), мезодермы (*FOXA2*, *BRACHYURY*), энтодермы (*AFP*, *SOX17*): 1 – кДНК мононуклеарных клеток крови; 2, 3 – кДНК линий ИПСК 1M_iALS и 3M_iALS соответственно. Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию производных трех зародышевых листков: энтодермы (α -фетопротейн, AFP), мезодермы (фибронектин, FN), эктодермы (нейрофиламент 200, NF200). Ядра окрашены DAPI. Масштабная линейка – 100 мкм; *в* – кариотип линии 2M_iALS; *г* – электрофореграмма участка экзона 4 гена *SOD1*, подтверждающая наличие одонуклеотидной замены в ИПСК

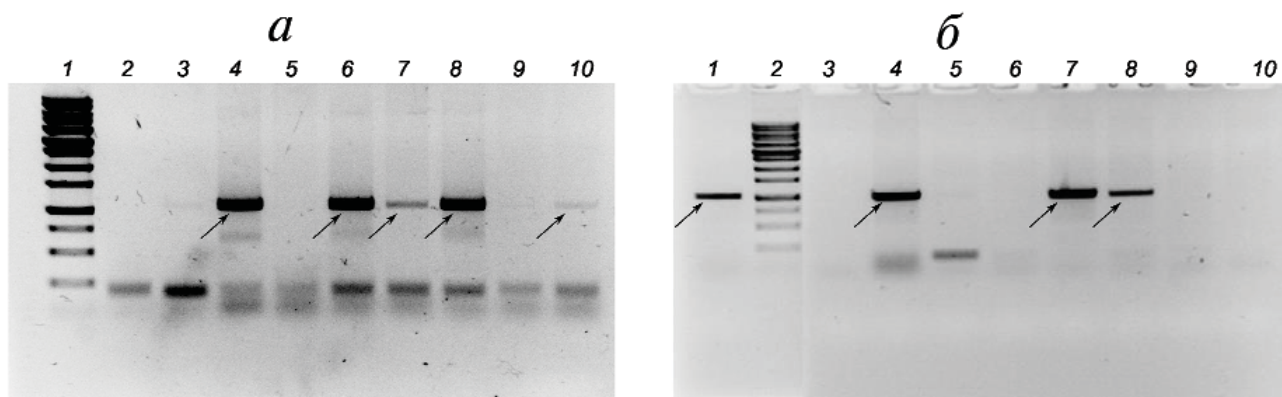


Рис. 2. ПЦР-анализ субклонов на наличие дополнительной случайной интеграции плазмиды в геном. *а* – Анализ субклонов линии 1M_iALS: 1 – ДНК-маркер (Sky-High, «Биолабмикс», Россия); 2 – вода; 3 – отрицательный контроль (геномная ДНК исходной линии, не содержащая вставки); 4 – положительный контроль (плазмидная ДНК, использованная в качестве донора для гомологичной рекомбинации); 5–10 – субклоны линии 1M_iALS, содержащие целевую вставку в локусе *AAVS1*: № 2, 7, 12, 16, 17 и 27 соответственно; *б* – анализ субклонов линии iMA_1L: 1 – положительный контроль (плазмидная ДНК, использованная в качестве донора для гомологичной рекомбинации); 2 – ДНК-маркер (Sky-High, «Биолабмикс», Россия); 3 – отрицательный контроль (геномная ДНК исходной линии, не содержащая вставки); 4–10 – субклоны линии 1M_iALS, содержащие целевую вставку в локусе *AAVS1*: № 4, 11, 17, 3.2, 6.2, 19.2 и 24.2 соответственно. Стрелками отмечен целевой продукт длиной 1063 п.н.

тельность плазмидного донора построена таким образом, что протоспейсер для CRISPR/Cas9, который используется для создания двухцепочечного разрыва в целевом сайте, отсутствует в структуре встраиваемой части плазмиды, что предотвращает как гидролиз самой донорной последовательности, так и последующий гидролиз вставки в геноме.

Данные биосенсоры можно использовать и для изучения патологических процессов, протекающих в моторных нейронах, полученных от больных нейродегенеративными заболеваниями, такими как БАС. Тем не менее для проведения подобных исследований необходима универсальная клеточная платформа, из которой возможно генерировать систему для исследования патологии в один шаг (рис. 3, б, в). В представленной работе описано получение такой системы, состоящей из пары линий ИПСК: пациент-специфичной линии, полученной от донора, больного БАС, и условно-здоровой контрольной линии, уже содержащих вставку трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии трансгенов (рис. 3, г). Для создания пациент-специфичной линии ИПСК были использованы мононуклеарные клетки периферической крови пациента с наследственной формой БАС, которые имеют мутацию D90A в гене *SOD1*. ИПСК демонстрируют характерную морфологию, свойственную стволовым клеткам, экспрессируют основные маркеры плюрипотентности и способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке. Хромосомный набор линий ИПСК стабилен, преобладают клетки с диплоидным

числом хромосом. Перестроек или aberrантных хромосом не обнаружено. Выявленная анеуплоидия некоторых клеток связана, скорее всего, с приготовлением препаратов.

Полученные пациент-специфичные ИПСК, наравне с контрольными ИПСК линии iMA_1L, были использованы для создания трансгенных линий, несущих вставку трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии, а также ген устойчивости к неомицину. Интеграция данной конструкции была произведена с помощью CRISPR/Cas9-индуцируемого разрыва в локусе *AAVS1*, который относится к локусам «Safe harbor» в геноме, и, следовательно, вставка в данный участок не влияет на функционирование клетки [36]. В результате были получены субклоны пациент-специфичных ИПСК линии 1M_iALS и контрольных ИПСК линии iMA_1L, толерантные к содержанию неомицина в ростовой среде. Среди отобранных субклонов только малая часть содержала интактный протоспейсер CRISPR/Cas9 на гомологичной хромосоме, что необходимо для последующего внесения конструкций, кодирующих биосенсоры.

Для поиска субклонов, у которых отсутствуют дополнительные интеграции плазмиды в геном, был использован метод ПЦР. Известно, что лишь часть донорной плазмиды должна интегрироваться в геном, если имеют место только целевые события. Следовательно, спустя определенное время после трансфекции будет невозможно детектировать те фрагменты плазмиды, которые не должны встраиваться в геном. При трансфекции было использовано 6 мкг (963,3 фмоль) pTA_donor на 10^6 клеток. При усло-

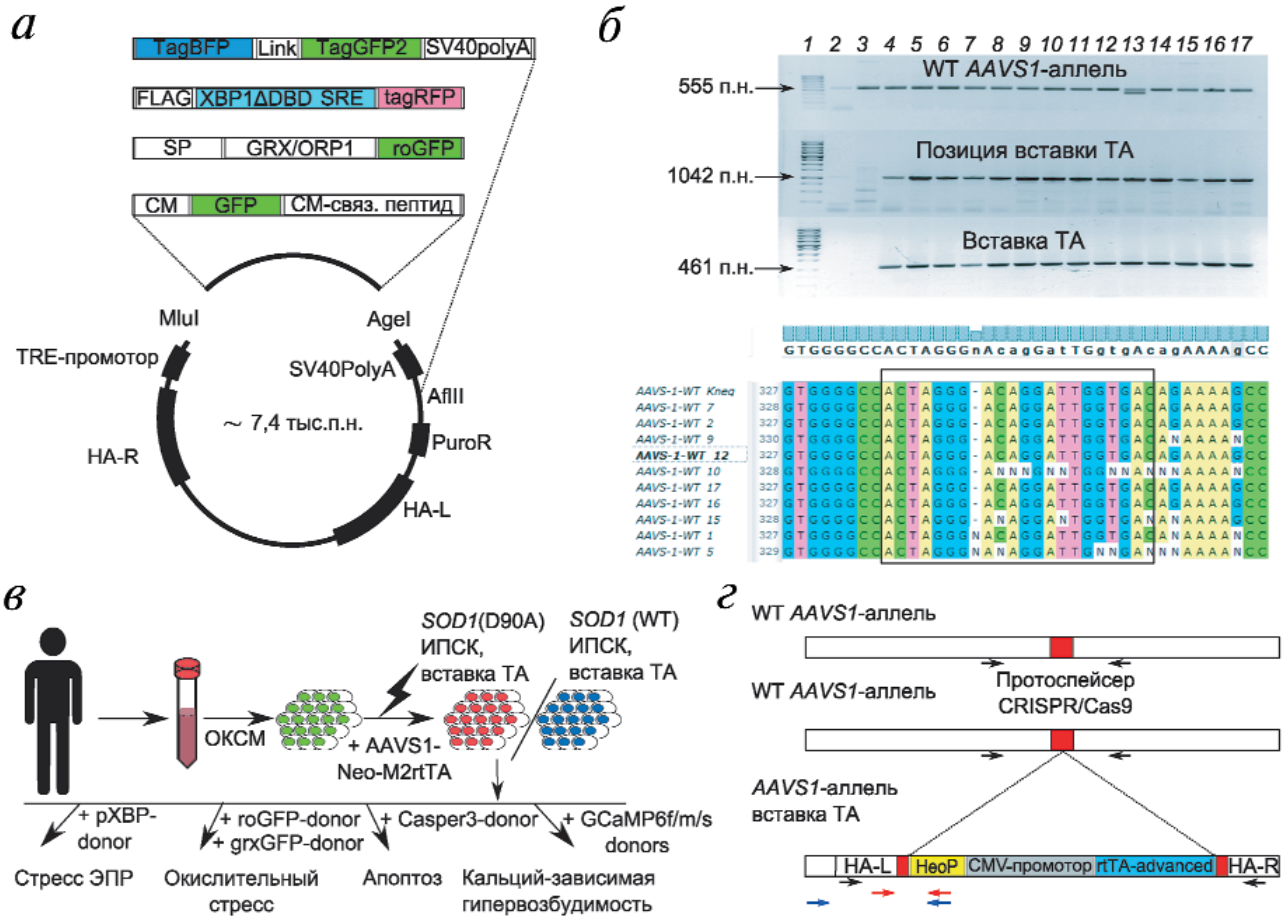


Рис. 3. Создание универсальной клеточной платформы для исследования нейродегенерации. Обозначения: WT – дикий тип, TA – трансактиватор для доксициклин-управляемой экспрессии трансгенов; *а* – схема строения полученных донорных плазмид. Показана общая для всех доноров основа, содержащая плечи гомологии к локусу *AAVS1* (HA-R, HA-L), промотор TRE (Tetracyclin responsive element) и ген устойчивости к пуromицину, и вариативная часть, содержащая функциональные элементы биосенсора. XBP1ΔDBD – участок гена *XBP1*, SRE – stress responsive element, SP – signal peptide, сигнальный пептид (для плазмид pMito-Grx1-roGFP2-donor, pMito-roGFP2-Orp1-donor) – субъединица АТФ-синтазы 9, Link – сайт гидролиза каспазой 3, CM – кальмодулин; *б* – ПЦР-анализ субклонов 1M_iALS на предмет наличия вставки, корректности ее положения в локусе *AAVS1*: 1 – ДНК-маркер (панели «WT *AAVS1*-аллель» и «Вставка TA» – Step 100, «Биолабмикс», Россия); панель «Позиция вставки TA» – Sky-High, «Биолабмикс», Россия); 2 – вода; 3 – отрицательный контроль – исходная линия ИПСК без вставки; 4–17 – субклоны 1M_iALS. Под электрофореграммой приведены результаты секвенирования локуса *AAVS1* гомологичной хромосомы. Рамкой отмечена область протоспейсера CRISPR/Cas9. Показано, что некоторые субклоны имеют мутации – результат внесенного двунитевого разрыва, исправленного с потерей нуклеотидов; *в* – стратегия использования полученной клеточной платформы для исследования БАС. ОКСМ – факторы репрограммирования OCT3/4, KLF4, SOX2, MYC; *г* – структура локуса *AAVS1* полученных трансгенных линий ИПСК. Показана вставка последовательности трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии трансгенов и разрушенный протоспейсер в одном аллеле и интактный протоспейсер в другом аллеле. Стрелки черного цвета – праймеры для ПЦР-амплификации продукта дикого типа *AAVS1*; стрелки красного цвета – праймеры для ПЦР-амплификации фрагмента вставки для подтверждения ее наличия; стрелки синего цвета – праймеры для ПЦР-амплификации фрагмента вставки и локуса *AAVS1* для подтверждения корректности позиции встраивания; *HeoP* – ген устойчивости к неомицину, *rtTA-advanced* – вариант трансактиватора для доксициклин-управляемой экспрессии

вии, что все копии плазмиды попадают внутрь клетки при электропорации, и учитывая размер плазмиды 10 080 п.н., получается, что на одну клетку приходилось $(963,3 \times 10^{-15} \text{ моль} \times 6,022 \times 10^{23}) / (1 \times 10^6) = 5,8 \times 10^5$ копий (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>). Но, поскольку в условиях эксперимента невозможно определить реальную долю плазмид, которые проникли внутрь клетки, в представленных далее рас-

четах авторы принимают, что все плазмиды были доставлены внутрь клетки. Если принять, что при каждом делении количество плазмиды в клетке уменьшается в 2 раза, то полная ее элиминация произойдет не позднее, чем через $\log_2 5,8 \times 10^5 = 19,146 \dots 20,000$ делений клетки, или через ~2 недели культивирования [37]. В результате анализа были обнаружены два субклона линии 1M_iALS и три субклона линии iMA_1L,

содержавшие единственную вставку трансактиватора в целевом сайте и не содержавшие дополнительных интеграций в геном.

В итоге мы получили универсальную клеточную платформу, которая имеет в составе как опытную линию ИПСК с патологической мутацией в гене *SOD1*, так и контрольную линию. Из описанных клеточных линий за один шаг можно создавать клеточные линии с встроеными биологическими сенсорами, необходимыми для исследования ряда патологических процессов, связанных с нейродегенерацией. Данная система позволяет исследовать тонкие нарушения, возникающие в моторных нейронах больного, переводить полученные от биосенсоров флуоресцентные сигналы в количественное выражение, тем самым открывая новый путь для поиска потенциальных модификаторов заболевания.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-34-00440) в части получения и характеристики пациент-специфичных ИПСК, внесения трансгенов в локус *AAVS1* и последующего анализа трансгенных линий, а также программы фундаментальных исследований Президиу-

ма РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (проект № 0324-2018-0042) в части конструирования плазмид-доноров, кодирующих последовательности биосенсоров.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Благодарности

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFME-FI62117X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
2. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917–1920, doi: 10.1126/science.1151526.
3. Wiethoff, S., Arber, C., Li, A., Wray, S., Houlden, H., and Patani, R. (2015) Using human induced pluripotent stem cells to model cerebellar disease: hope and hype, *J. Neurogenet.*, **29**, 95–102, doi: 10.3109/01677063.2015.1053478.
4. Ghaffari, L.T., Starr, A., Nelson, A.T., and Sattler, R. (2018) Representing diversity in the dish: using patient-derived *in vitro* models to recreate the heterogeneity of neurological disease, *Front. Neurosci.*, **12**, 1–18, doi: 10.3389/fnins.2018.00056.
5. Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., Carson, C.T., Laurent, L.C., Marsala, M., Gage, F.H., Remes, A.M., Koo, E.H., and Goldstein, L.S.B. (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells, *Nature*, **482**, 216–220, doi: 10.1038/nature10821.
6. Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S.N., and Cheng, L. (2011) Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease, *Blood*, **118**, 4599–4608, doi: 10.1182/blood-2011-02-335554.
7. Ananiev, G., Williams, E.C., Li, H., and Chang, Q. (2011) Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as *in vitro* disease model, *PLoS One*, **6**, e25255, doi: 10.1371/journal.pone.0025255.
8. Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., and Eggan, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, *Science*, **321**, 1218–1221, doi: 10.1126/science.1158799.
9. Alves, C.J., Dariolli, R., Jorge, F.M., Monteiro, M.R., Maximino, J.R., Martins, R.S., Strauss, B.E., Krieger, J.E., Callegaro, D., and Chadi, G. (2015) Gene expression profiling for human iPSC-derived motor neurons from sporadic ALS patients reveals a strong association between mitochondrial functions and neurodegeneration, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 289, doi: 10.3389/fncel.2015.00289.
10. Wijesekera, L.C., and Leigh, P.N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis, *Orphanet J. Rare Dis.*, **4**, 3, doi: 10.1186/1750-1172-4-3.
11. Brites, D., and Vaz, A.R. (2014) Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity, *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 117, doi: 10.3389/fncel.2014.00117.
12. Celeste, D.B., and Miller, M.S. (2018) Reviewing the evidence for viruses as environmental risk factors for ALS: a new perspective, *Cytokine*, **108**, 173–178, doi: 10.1016/j.cyto.2018.04.010.

13. Oskarsson, B., Horton, D.K., and Mitsumoto, H. (2015) Potential environmental factors in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurol. Clin.*, **33**, 877–888, doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.009.
14. Ajroud-Driss, S., and Siddique, T. (2014) Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS), *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 679–684, doi: 10.1016/j.bbadis.2014.08.010.
15. Abel, O., Powell, J.F., Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2012) ALSod: a user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics, *Hum. Mutat.*, **33**, 1345–1351, doi: 10.1002/humu.22157.
16. Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N., and Kuroiwa, Y. (2010) The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases, *Neurosci. Res.*, **66**, 131–133, doi: 10.1016/j.neures.2009.10.004.
17. Cortese, A., Plagnol, V., Brady, S., Simone, R., Lashley, T., Acevedo-Arozena, A., de Silva, R., Greensmith, L., Holton, J., Hanna, M.G., Fisher, E.M.C., and Fratta, P. (2014) Widespread RNA metabolism impairment in sporadic inclusion body myositis TDP43-proteinopathy, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1491–1498, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.029.
18. Watson, M.R., Lagow, R.D., Xu, K., Zhang, B., and Bonini, N.M. (2008) A *Drosophila* model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1, *J. Biol. Chem.*, **283**, 24972–24981, doi: 10.1074/jbc.M804817200.
19. Sakowski, S.A., Lunn, J., Busta, A.S., Oh, S., Zamora-Berridi, G., Palmer, M., Rosenberg, A.A., Philip, S.G., Dowling, J.J., and Feldman, E.L. (2012) Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish, *Mol. Neurodegener.*, **7**, 44, doi: 10.1186/1750-1326-7-44.
20. Allen, S.P., Rajan, S., Duffy, L., Mortiboys, H., Higginbottom, A., Grierson, A.J., and Shaw, P.J. (2014) Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1499–1509, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.025.
21. Richardson, K., Allen, S.P., Mortiboys, H., Grierson, A.J., Wharton, S.B., Ince, P.G., Shaw, P.J., and Heath, P.R. (2013) The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type, *PLoS One*, **8**, e68256, doi: 10.1371/journal.pone.0068256.
22. Gutschner, M., Pauleau, A.-L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential, *Nat. Methods*, **5**, 553–559, doi: 10.1038/nmeth.1212.
23. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2004) A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress, *Nat. Med.*, **10**, 98–102, doi: 10.1038/nm970.
24. Schwarzlander, M., Dick, T.P., Meyer, A.J., and Morgan, B. (2016) Dissecting redox biology using fluorescent protein sensors, *Antioxid. Redox Signal.*, **24**, 680–712, doi: 10.1089/ars.2015.6266.
25. Esposito, S., Masala, A., Sanna, S., Rassu, M., Pimxayvong, V., Iaccarino, C., and Crosio, C. (2017) Redox-sensitive GFP to monitor oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Rev. Neurosci.*, **28**, 133–144, doi: 10.1515/revneuro-2016-0041.
26. Morgan, B., Sobotta, M.C., and Dick, T.P. (2011) Measuring E(GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes, *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 1943–1951, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.035.
27. Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., and Blumberg, R.S. (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease, *Cell*, **134**, 743–756, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.021.
28. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1, *Genes Dev.*, **22**, 1451–1464, doi: 10.1101/gad.1640108.
29. Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., Looger, L.L., Svoboda, K., and Kim, D.S. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, *Nature*, **499**, 295–300, doi: 10.1038/nature12354.
30. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **8**, 2281–2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
31. Soares, F.A.C., Pedersen, R.A., and Vallier, L. (2015) *Induced pluripotent stem (iPS) cells*. *Methods Mol. Biol.* (Turksen, K., and Nagy, A. eds), Humana Press, N.Y., pp. 23–31, doi: 10.1007/7651_2015_202.
32. Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013) An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells, *Stem Cells*, **31**, 458–466, doi: 10.1002/stem.1293.
33. Medvedev, S.P., Grigor'eva, E.V., Shevchenko, A.I., Malakhova, A.A., Dementyeva, E. V., Shilov, A.A., Pokushalov, E.A., Zaidman, A.M., Aleksandrova, M.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., and Zakian, S.M. (2011) Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage, *Stem Cells Dev.*, **20**, 1099–1112, doi: 10.1089/scd.2010.0249.
34. Minina, J.M., Borodin, P.M., Searle, J.B., Volobouev, V.T., and Zhdanova, N.S. (2007) Standard DAPI karyotype of the common shrew *Sorex araneus* L. (Soricidae, Eulipotyphla), *Russ. J. Teriology*, **6**, 3–6, doi: 10.15298/rusjtheriol.6.1.02.
35. DeKelver, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijnsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., Tam, P., Bartsevich, V.V., Meng, X., Rupniewski, I., Gopalan, S.M., Sun, H.C., Pitz, K.J., Rock, J.M., Zhang, L., Davis, G.D., Rebar, E.J., Cheeseman, I.M., Yamamoto, K.R., Sabatini, D.M., Jaenisch, R., Gregory, P.D., and Urnov, F.D. (2010) Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome, *Genome Res.*, **20**, 1133–1142, doi: 10.1101/gr.106773.110.
36. Papapetrou, E.P., and Schambach, A. (2016) Gene insertion into genomic safe harbors for human gene therapy, *Mol. Ther. Am. Soc. Gene Cell Ther.*, **24**, 678–684, doi: 10.1038/mt.2016.38.
37. Wadkin, L.E., Elliot, L.F., Neganova, I., Parker, N.G., Chichagova, V., Swan, G., Laude, A., Lako, M., and Shukurov, A. (2017) Dynamics of single human embryonic stem cells and their pairs: a quantitative analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 570, doi: 10.1038/s41598-017-00648-0.
38. Gonzalez, F., Zhu, Z., Shi, Z.-D., Lelli, K., Verma, N., Li, Q.V., and Huangfu, D. (2014) An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **15**, 215–226, doi: 10.1016/j.stem.2014.05.018.
39. Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016) High-fidelity

- CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects, *Nature*, **529**, 490–495, doi: 10.1038/nature16526.
40. Gutscher, M., Sobotta, M.C., Wabnitz, G.H., Ballikaya, S., Meyer, A.J., Samstag, Y., and Dick, T.P. (2009) Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **284**, 31532–31540, doi: 10.1074/jbc.M109.059246.

PLATFORM FOR STUDYING NEURODEGENERATION MECHANISMS USING GENETICALLY ENCODED BIOSENSORS

E. I. Ustyantseva^{1,2,3,4}, S. P. Medvedev^{1,2,3,4}, A. S. Vetchinova⁵,
J. M. Minina¹, S. N. Illarioshkin⁵, and S. M. Zakian^{1,2,3,4*}

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: Zakian@bionet.nsc.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia

³ Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health
of the Russian Federation, 630055 Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

⁵ Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

Received October 14, 2018

Revised November 11, 2018

Accepted November 11, 2018

Patient-specific induced pluripotent stem cells (IPSCs) represent a promising source for studying pathological processes and search for methods of their correction, since they are capable to differentiate into desirable cell type. However, to date, conventional strategies for using IPSCs in disease research are not yet established. Genetically encoded biosensors enable us to register messengers, metabolites and enzyme activity in real time and present these signals quantitatively, thus providing possibility to assess the impact of certain molecules on development of a pathology. In this article we present the development of universal cell-based platform for studying pathological processes involved in amyotrophic lateral sclerosis. A number of plasmid constructs for insertion into cell genome of genetically encoded biosensors allowing investigation of endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺-dependent hyperexcitability has been created. Moreover, two transgenic IPSC lines (with *SOD1* gene mutation and healthy control) have been obtained, which carry an insert of a transactivator for doxycycline-controlled gene expression and can be used for a single-step insertion of various biosensors.

Keywords: induced pluripotent stem cells, biosensors, CRISPR/Cas9