

РНК-РЕДАКТИРОВАНИЕ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ ADAR В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНЕЙ ЭКСПАНСИИ CAG-ПОВТОРОВ: ЗНАЧИМЫЙ ЭФФЕКТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНОИДЫ МОЗГА ПРИ ОТСУТСТВИИ СУЩЕСТВЕННОГО ВЛИЯНИЯ ЧИСЛА ПОВТОРОВ НА УРОВЕНЬ РЕДАКТИРОВАНИЯ

© 2024 В.В. Кудрявский^{1,2*}, А.О. Гончаров^{1,2}, А.В. Еремеев², Е.С. Ручко²,
В.А. Веселовский², К.М. Климина², А.Н. Богомазова², М.А. Лагарькова²,
С.А. Мошковский^{1,2*}, А.А. Ключникова^{1,2,3}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия;
электронная почта: wkudriavskii@gmail.com; moshrrfi@gmail.com

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия

³ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.04.2024

После доработки 24.06.2024

Принята к публикации 11.07.2024

Экспансия CAG-повторов в некоторых генах представляет собой установленную причину нескольких нейродегенеративных заболеваний, механизм патогенеза которых при этом остается неясным. Предполагается, что двухцепочечные регионы РНК, формируемые CAG-повторами, имеют токсические для клетки свойства. В работе проверяется гипотеза, согласно которой такие регионы РНК гипотетически могут отвлекать на себя ферменты редактирования РНК ADAR, тем самым снижая А→I редактирование РНК в клетке, что приводит к активации интерферонового ответа. Исследовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные из фибробластов пациентов, страдающих болезнью Гентингтона или атаксией типа 17, и дифференцированные из них органоиды среднего мозга. Для оценки редактирования в выбранных участках РНК разработали таргетную панель для секвенирования нового поколения. Дифференцировка ИПСК в органоиды мозга сопровождалась повышением экспрессии гена, кодирующего ADAR2, при снижении экспрессии белков-ингибиторов редактирования РНК. Как следствие, отмечали рост редактирования соответствующих субстратов ADAR2, тем самым имея возможность идентифицировать дифференциальные субстраты изоформ ADAR. При этом на уровне ИПСК сравнение групп патологии и контроля не выявило различий по уровню редактирования. В органоидах мозга, содержащих 42–46 CAG-повторов, также не наблюдали глобальных изменений. Однако органоиды мозга в образце, характеризуемом наибольшим количеством CAG-повторов в гене гентингтина (76), выделялись резким снижением уровня редактирования РНК отдельных транскриптов, в редактировании которых, предположительно, участвует ADAR1. В частности, в этом образце практически отсутствовало редактирование длинной некодирующей РНК PWAR5. В итоге показано, что в большинстве культур с экспансией повторов гипотеза о ее влиянии на редактирование РНК не подтвердилась.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: редактирование РНК, РНК-зависимая аденозиндезаминаза, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, болезнь Гентингтона, атаксия типа 17, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органоиды среднего мозга.

DOI: 10.31857/S0320972524080063 EDN: KDYQCE

Принятые сокращения: днРНК – длинная некодирующая РНК; дцРНК – двухцепочечный участок РНК; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ADAR – РНК-зависимая аденозиндезаминаза; HD – болезнь Гентингтона; PKR – протеинкиназа R; PWAR – РНК регион, ассоциированный с синдромом Прадера-Вилли и Ангельмана; SCA17 – спиноцеребеллярная атаксия типа 17.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Тринуклеотидные повторы располагаются в генах с различными функциями, которые экспрессируются в различных тканях, однако патологические состояния, связанные с экспансией повторов, в первую очередь влияют на определенные популяции нейронов. Например, атаксия типа 17 (SCA17) вызвана повторами CAG в ТАТА-связывающем белке (ген *TBP*), который при этом является широко распространенным фактором транскрипции, экспрессируемым во всех клетках. Гентингтин (*HTT*) – еще один пример гена, содержащего CAG-повторы, также экспрессируется повсеместно и обладает плеiotропной функцией [1]. Несмотря на то что повторы CAG возникают в разных генах, фенотипы заболеваний, которые они вызывают, обладают некоторым сходством. Из этого предполагают общий механизм, лежащий в основе нейродегенерации, вызванной экспансией тринуклеотидных повторов. Однако на сегодняшний день этот механизм остается предметом дискуссий. Обсуждается как вклад мутантного белка, так и мутантной РНК в процессы нейродегенерации [2]. Также неясно, почему для проявления заболевания необходимо различное количество повторов. Например, 36–40 повторов CAG в гене *HTT* приводят к неполной пенетрантности болезни Гентингтона (HD) [3], в то время как 41–48 повторов в гене *TBP* вызывают атаксию типа 17 со сниженной пенетрантностью. Стоит отметить, что пониженная пенетрантность SCA17 в случаях с количеством повторов менее 48 ассоциирована с наличием конкретного варианта в гене *STUB1* для полного проявления [4].

Ранние исследования болезней экспансии CAG-повторов были сосредоточены на изучении вклада полиглутаминового тракта, кодируемого триплетами CAG, в патогенез заболевания [5]. Предполагалось, что полиглутаминовый тракт запускает агрегацию белка и последующую гибель клеток [6]. Однако существуют доказательства того, что РНК, содержащая CAG-повторы, нейротоксична, то есть патологический процесс индуцирует непосредственно РНК. Это доказывается теми случаями, когда повторы CAG, даже находясь в нетранслируемых регионах, все равно приводят к заболеваниям, как в случае атаксии типа 12 (SCA12) [7]. Также примечательно, что прерывание CAG-тракта триплетом CAA, также кодирующим глутамин, задерживает манифестацию заболевания [8]. Следовательно, CAG-тракт в РНК должен играть первостепенную роль в патогенезе заболеваний, связанных с экспансией повторов, хотя полиглутаминовые тракты, несомненно, влияют на протекание патогенеза.

В результате провели исследования токсичности РНК, содержащей повторы CAG. Например, доказательства патогенности таких РНК уже наблюдали у плодовых мушек [9], *Caenorhabditis elegans* [10], а также у мышей [11].

Редактирование РНК – это естественный процесс ферментативной модификации транскриптов. Этот процесс может привести к перекодированию белка – несинонимичной замене аминокислот в результате редактирования экзон [12], к сдвигу рамки считывания за счет появления нового старт-кодона [13], к изменению длины белок-кодирующей области мРНК при образовании новых или модификации старых стоп-кодонов [14] и к альтернативному сплайсингу в случае дезаминирования аденозина [15]. У человека известны только два типа редактирования РНК: дезаминирование цитозина и аденозина. Последний является преобладающим и приводит к замене аденозина на инозин (A→I). Этот процесс катализируется аденозиндеаминазами, действующими на РНК (ADAR), и происходит только в двухцепочечных участках РНК (дцРНК) [16, 17]. В результате такого дезаминирования происходит дестабилизация и расплетение РНК-дуплекса, поскольку пара тимидина с инозином менее стабильная, чем с аденозином. Стоит отметить, что редактирование РНК – это конститутивный процесс посттранскрипционной модификации, происходящий в большинстве клеток человека и предотвращающий чрезмерное производство интерферона типа I в ответ на присутствие избыточного эндогенного количества дцРНК, которое имитирует соответствующие вирусные геномы, тем самым запуская противовирусный иммунный ответ [18]. Таким образом, активность ADAR1 предотвращает спонтанную активацию сенсоров дцРНК в ответ на эндогенную дцРНК [19, 20]. A→I редактирование РНК в конкретном остатке обычно не имеет стопроцентного выхода реакции, поэтому существует доля отредактированных аденозинов, то есть уровень редактирования. Корректное редактирование РНК необходимо для обеспечения нормальной жизнедеятельности и правильного функционирования нейронов [21]. Так, соотношение перекодированных и исходных протеоформ может влиять на дифференцировку клеток и развитие нервной системы [22, 23]. Из этого следует, что изменения профиля редактирования РНК могут быть вовлечены в различные заболевания нервной системы. Например, геномные мутации ADAR у человека вызывают синдром Айкарди-Гутьереса – воспалительное заболевание, поражающее мозг и кожу [24]. Кроме того, мутации в домене Zα ADAR вызывают двусторонний некроз полосатого тела [25]. Помимо этого, инозин распознается как гуанозин при трансля-

ции матричной РНК. Изоформа ADAR2 (*ADARB1*), как показано, вызывает большую часть таких, кодирующих аминокислотные замены, событий редактирования. Более 10% замен А→І в РНК приводят к перекодированию белка [26, 27]. Сформулированы гипотезы, что изменения в редактировании, опосредованном ADAR2, способствовали развитию неврологических заболеваний, таких как эпилепсия [28], аффективное расстройство и шизофрения [29]. Кроме того, в гиппокампе пациентов с эпилепсией [30] наблюдались изменения профиля ADAR2-опосредованного редактирования РНК.

Молекулярные механизмы, вовлеченные в патогенез болезней экспансии CAG-повторов, пересекаются с механизмами, в которых участвует редактирование РНК. Например, сенсор дцРНК PKR активируется в клетках, пораженных патологическим количеством повторов, причем уровень активации PKR коррелирует с количеством повторов [31]. ADAR1, как было упомянуто выше, вовлечен в модуляцию этого пути иммунного ответа. Кроме того, шпильковые структуры, состоящие из повторов CXG, могут использоваться в качестве субстрата для рибонуклеазы Dicer, что приводит к инактивации РНК посредством РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC) [32]. Мономер ADAR1, в свою очередь, образует комплекс с Dicer, чтобы направить его к дцРНК и тем самым усилить выключение генов [33]. Более того, достаточно длинные повторы CXG образуют шпильку двухцепочечной РНК, а также Z-структуры в ДНК [34]. Таким образом, РНК-связывающие белки (RBP) могут участвовать в патогенезе болезней экспансии повторов путем секвестрации на дцРНК, образуемой повторами [35]. Ферменты ADAR, в свою очередь, имеют домен связывания дцРНК (RBD), а ADAR1 p150 имеет также домен связывания Z-ДНК, так что эти ферменты потенциально могут связываться со шпильками, состоящими из повторов CXG. Например, повторы GGGGCC ассоциированы с патогенезом бокового амиотрофического склероза (БАС). Недавно было продемонстрировано, что РНК, содержащая повторы GGGGCC, может секвестрировать ADAR3 (ген *ADARB2*). При этом нокаун гена *ADARB2* значительно снижал количество нейронов с ядерными включениями РНК, образующимися при дифференцировке нейронов из плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с БАС [36]. Кроме того, в этой же работе исследователи отметили чувствительность нейронов, экспрессирующих патологическое количество повторов GGGGCC, к глутамат-опосредованной эксайтотоксичности. Это согласуется с предыдущими исследованиями относительно эксайтотоксических эффектов, возникающих в результате недостаточного редакти-

рования РНК субъединицы глутаматного рецептора GluR2 (*GRIA2*) [37, 38]. В другом исследовании продемонстрировали изменения редактирования РНК, вызванные aberrантной локализацией ADAR2 в цитоплазме клеток, экспрессирующих патологическое количество GGGGCC-повторов [39]. Помимо этого, триплеты CAG представляют собой один из самых предпочтительных субстратов ферментов ADAR [40]. Шпильки РНК длиной 15 спаренных нуклеотидов достаточно для ADAR-опосредованного редактирования, а длина этой шпильки коррелирует с уровнем редактирования [41]. Таким образом, дополнительные остатки аденозина в двухцепочечных участках РНК, образованных вследствие экспансии повторов, могут служить дополнительным субстратом для конститутивной формы ADAR1 (ADAR1 p110) в ядре, а также для интерферон-индуцируемой изоформы ADAR1 p150 и ADAR2 в цитоплазме. Интересно, что аномальное функционирование ADAR в контексте обратной транскрипции уже было предложено в качестве механизма, участвующего в патогенезе экспансии повторов в нейронах [42].

Принимая во внимание все вышесказанное, можно предположить, что нарушение редактирования РНК может быть вовлечено в патогенез заболеваний, связанных с экспансией CAG-повторов. В этом исследовании мы провели таргетный анализ дифференциального А→І редактирования в выбранных участках различных РНК с использованием клеточных моделей болезней экспансии CAG-повторов на примере индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов, страдающих болезнью Гентингтона или атаксией типа 17, и органоидов среднего мозга, дифференцированных из ИПСК. Целью этого анализа было сравнение уровня редактирования в патологических и нормальных клеточных моделях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Перечень использованных линий ИПСК и соответствующих заболеваний с указанием количества CAG-повторов представлен в табл. П1 в Приложении.

В работе по получению нейрональных предшественников и органоидов среднего мозга использовались линии ИПСК, полученные репрограммированием фибробластов кожи пациентов со спинocerebellарной атаксией типа 17 (линии SCA17.9L и SCA17S5S, SCA17.4sev и SCA17.8sev) и с болезнью Гентингтона (линии HD76.1S, HD42.1.2, HD46.5S). Данные клеточные линии были охарактеризованы согласно протоколам,

изложенным ранее [43]. В качестве контроля использовали линии ИПСК, RG4S, FF1S и Huv4S5, полученные репрограммированием из фибробластов здоровых доноров без избыточного числа CAG-повторов [44].

Дифференцировку ИПСК в органоиды среднего мозга проводили с использованием метода, описанного Ereemeev et al. [45].

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного окрашивания органоиды промывали 1× фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде в PBS, затем заливали жидкостью для заморозки ткани («Leica», Германия), замораживали в парах жидкого азота в течение 5 мин, после чего делали срезы толщиной 5–10 мкм на криотоме Thermo («Thermo Fisher Scientific», США). Срезы фиксировали на предметном стекле охлажденным до –20 °C ацетоном в течение 5 мин, промывали дважды по 5 мин PBS. Инкубировали в блокирующем буфере с первичными антителами на нейрональные маркеры MAP2 («ELK Biotechnology», США) и GFAP («Dako», Дания) в течение ночи во влажной камере при 4 °C. Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20, содержащем 5% эмбриональной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) и 2% сыворотки козы, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20. Вторичные антитела («Invitrogen», США), конъюгированные с флуоресцентными метками (Alexa 488, Alexa 555), наносили в разведениях, рекомендованных производителем, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте, отмывали 3 раза по 5 мин в PBS с 0,1% (v/v) Tween 20. Затем препараты инкубировали в течение 10 мин с 4',6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI) в концентрации 0,1 мкг/мл в PBS для визуализации ядер; отмывали 2 раза PBS. Полученные препараты исследовали под флуоресцентным микроскопом Olympus IX53 («Olympus», Япония).

Сайты редактирования РНК для таргетной оценки. Основываясь на работах по протеогеномному поиску перекодируемых пептидов [46, 47], мы выбрали общие для человека и мыши сайты редактирования РНК, которые наблюдались как в транскриптомных, так и в протеомных наборах данных. Кроме того, мы добавили в наш список заслуживающие внимания сайты РНК, подвергающиеся редактированию в клеточных линиях глиобластомы [48]. К ним относятся сайты редактирования генов *HTR2C*, *PWAR5*, *BLCAP* и *ZNF669*. Все выбранные сайты представлены в табл. П2А в Приложении.

Дизайн праймеров. Праймеры для секвенирования РНК были разработаны, используя следующие параметры: длина праймера – 15–25 нуклеотидов; GC-состав – 40–75%; температура плавления – 58–65 °C. Размер ампликона должен быть в диапазоне 260–450 п.н., а сайт редактирования должен быть расположен в диапазоне 70–115 п.н. от конца ампликона. Праймеры для количественной ПЦР (кПЦР) были разработаны, используя следующие параметры: длина ампликона – 50–200 п.н.; длина праймеров – 15–20 нуклеотидов; температура плавления – 62 °C. Все праймеры были разработаны с использованием Primer-BLAST [49] и последовательности комплементарной ДНК (кДНК) из базы данных эталонных последовательностей NCBI [50]. Каждую сконструированную пару праймеров тестировали на неспецифическую амплификацию с использованием Primer-BLAST. Было подтверждено, что каждая пара соответствует одному ампликону ПЦР с известной ожидаемой длиной в запланированных условиях постановки ПЦР. Отсутствие образования шпилечных структур и димеров у подобранных праймеров проверяли с помощью OligoAnalyzer [51]. Пары праймеров для таргетного секвенирования РНК и кПЦР представлены в табл. П2А и П3А соответственно в Приложении. Синтез праймеров проведен компанией «Евроген» (Россия).

Пробоподготовка РНК. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy plus mini kit («QIAGEN», Германия), согласно протоколу производителя. Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле. Концентрацию тотальной РНК определяли на флуориметре Qubit 4 («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора Qubit RNA BR Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Выделенную РНК в количестве 5–10 мкг очищали от примесей геномной ДНК с помощью набора TURBO DNA-free Kit («Thermo Fisher Scientific»), после чего снова измеряли концентрацию. кДНК синтезировали из 1 мкг очищенной РНК с использованием набора MINT Universal kit («Евроген»). Обратная транскрипция осуществлялась по протоколу производителя с использованием термоциклера MiniAmp Plus («Thermo Fisher Scientific»). Полученную кДНК разводили в 10 раз и использовали для определения уровня редактирования РНК и кПЦР.

Количественная ПЦР. Экспрессию генов определяли методом кПЦР на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США) в 96-луночных планшетах («Bio-Rad»). Реакции ставили с использованием коммерческого набора для ПЦР в реальном времени qPCRMix-HS SYBR («Евроген») в соответствии с протоколом производителя, финальный объем реакции составлял 25 мкл.

ПЦР проводили в трех технических повторах при следующих условиях: 95 °C – 3 мин; 94 °C – 15 с, 61 °C – 10 с, 72 °C – 15 с, 39 циклов. Проводили нормализацию средним геометрическим по двум генам (*TBP* и *ACTB*), поскольку такой метод был показан как более стабильный при оценке изменений экспрессии при дифференцировке нейронов, чем использование одного гена.

Таргетная амплификация РНК. Амплификацию регионов, содержащих сайты редактирования, проводили на ПЦР-системе ProFlex 3 × 32-well («Thermo Fisher Scientific») с использованием ПЦР-набора Tersus Plus («Евроген»). Реакционную смесь готовили в соответствии с протоколом производителя до финального объема 15 мкл. Для каждого фрагмента эмпирически подбирались оптимальные условия ПЦР, позволяющие повысить выход целевых ПЦР-фрагментов и избежать образования неспецифического продукта в реакциях. Все реакции амплифицировали в следующих условиях, если не указано иное: 95 °C – 2 мин; 95 °C – 30 с, X °C – 30 с, 72 °C – 30 с, 39 циклов, где X – температура отжига, специфичная для каждой отдельной пары праймеров. Условия для каждой пары праймеров представлены в табл. П2А в Приложении. Полученные ампликоны разделяли, визуализировали и анализировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Состав геля: агароза – 2%, 1× Tris-ацетатный (ТАЕ) буфер («Литех», Россия), ДНК-маркер 1кб («Евроген»), бромистый этидий 10 мг/мл («Геликон», Россия). Образцы загружали в лунки геля с помощью загрузочного буфера 4× Gel Loading Dye, Blue («Евроген»). Электрофорез проводили в 1× ТАЕ-буфере при напряжении 180 В в течение часа с использованием источника питания «Эльф-8» («ДНК-технология», Россия). Когда амплификация приводила к появлению неспецифических продуктов, требовалась гель-экстракция (табл. П2А в Приложении). Множественные ампликоны разделяли в 1,5%-ном агарозном геле, вырезали и очищали с помощью коммерческого набора Cleanup S-Cap («Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Целевые продукты ПЦР вырезали с помощью скальпеля и пинцета. Для элюирования образцов из колонки использовали 20 мкл элюирующего раствора с целью получения растворов с высокой концентрацией ампликонов.

Подготовка библиотек. Ампликоны для каждого образца смешивали в эквимоларной концентрации, а затем присваивали уникальный индекс для идентификации. Для этого концентрацию каждого ампликата измеряли на флуориметре Qubit Flex («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора Qubit™ dsDNA BR Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Смеси ампликонов очищали с использованием набора Agencourt AMPure XP

(«Beckman Coulter Inc.», США) по стандартному протоколу. Очищенную кДНК использовали для создания библиотек с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext® Ultra II for Illumina («Illumina», США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК в библиотеках определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 («Invitrogen») с использованием набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit («Invitrogen»), согласно рекомендациям производителя. Качество приготовленных библиотек оценивали с помощью микрофлюидного анализатора BioAnalyzer 2100 («Agilent», США) с использованием набора Agilent DNA High Sensitivity Kit («Agilent»), согласно инструкции производителя.

Секвенирование РНК. Библиотеки смешивали в эквимоларных соотношениях для приготовления 4 нМ раствора библиотеки. Для секвенирования полученной библиотеки, разбавленной до 10 пМ, использовали набор MiSeq Nano Reagent Kit v2 (500 циклов) («Illumina») в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina») с использованием набора парных прочтений 2 × 250 п.н. с добавлением 20% PhiX в качестве контроля.

Анализ дифференциального редактирования РНК. Качество необработанных данных секвенирования оценивалось с помощью fastQC (версия 0.11.8) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) с последующим препроцессингом с помощью fastp (версия 0.22.0) [52]. Затем чтения были выровнены на референсный геном человека GRCh38.p14 с помощью STAR (версия 2.7.10b) [53], используя параметры по умолчанию, и отфильтрованы с помощью samtools [54]. Далее, используя сгенерированные bam-файлы, детектировали сайты редактирования РНК, используя REDIttools [55]. Выходные данные REDIttools были отфильтрованы следующим образом: эталонный аллель – А (Т); альтернативный аллель – G (C); сайт представлен в базе данных REDItportal [56]; генерируемое REDIttools *p*-value ниже 0,05; уровень редактирования сайта – более 0,01%. Кроме того, каждый сайт редактирования РНК должен быть представлен в не менее чем двух образцах каждой группы (HD, SCA17, контроль), иначе он исключался из анализа. Анализ дифференциального редактирования между ИПСК и органоидами мозга проводили с использованием парного критерия Уилкоксона. Для сравнения редактирования РНК между патологиями и контролем использовали REDIT LLR – основанный на бета-биномиальных моделях инструмент для анализа дифференциального редактирования РНК [57]. Последующий анализ проводился с использованием языка программирования R 4.2.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Таргетная панель для анализа выбранных участков А→І редактирования РНК. ИПСК получали из фибробластов, взятых от 3-х здоровых доноров, 3-х пациентов с болезнью Гентингтона (HD) с различной длиной CAG-повторов (42, 46 и 76) в гене *HTT* и 2-х пациентов со спиноцеребеллярной атаксией типа 17 (SCA17), содержащих 45 повторов CAG в гене *TBP*. Среди последних один пробанд (женщина) содержал 45 CAG-повторов в гене *TBP*, однако не имел клинических симптомов заболевания. Затем полученные ИПСК дифференцировали в органоиды среднего мозга, согласно методике, описанной Eremin et al. [45]. Полученные органоиды характеризовали, используя фазово-контрастную микроскопию и иммунофлуоресцентное окрашивание на нейрональные маркеры MAP2 и GFAP. Все органоиды экспрессировали исследуемые маркеры (рис. 1).

Для проведения таргетного анализа редактирования РНК выбрали сайты редактирования РНК, которые были идентифицированы нами ранее как в транскрипте, так и в протеоме человека и мыши [46, 47], а также в клеточных линиях глиобластомы [48]. Кодрующие аминокислотные замены сайты, обнаруженные при анализе протеома, располагались внутри мРНК следующих генов: *CADPS*, *COPA*, *CYFIP2*, *FLNA*,

FLAB, *GRIA2*, *GRIA3*, *GRIA4* и *IGFBP7*. Дополнительно в исследование включали сайты редактирования РНК генов *HTR2C*, *BLCAP*, *EEF1AKMT2*, *FLNB*, *CCNI*, *SRP9*, *TROAP*, *ZNF669*, а также длинной некодирующей РНК (днРНК) *PWAR5* (все отобранные сайты представлены в табл. П2А в Приложении).

Таким образом, мы провели таргетное секвенирование РНК 23 ампликонов, полученных из ИПСК и органоидов среднего мозга, чтобы получить данные с высоким покрытием для каждого выбранного сайта редактирования РНК. При секвенировании всего транскриптома дифференциальная экспрессия транскриптов приводит к неравномерному покрытию сайтов редактирования, что влияет на обнаружение и статистический анализ событий редактирования [58]. При этом профили редактирования не зависят от количества циклов амплификации в диапазоне от 19 до 34 циклов [59]. Другими словами, таргетное секвенирование РНК увеличивает покрытие участка считываниями и повышает достоверность анализа уровня редактирования РНК.

В итоге покрытие РНК интересующих нас участков составляло до 16 000 прочтений, а в среднем – 3508 (табл. П4А–П4В в Приложении). В результате фильтрации из 23 изначально выбранных сайтов 3 были исключены из анализа, поскольку их прочтения не были представлены во всех группах выборки (табл. П2А в Приложении).

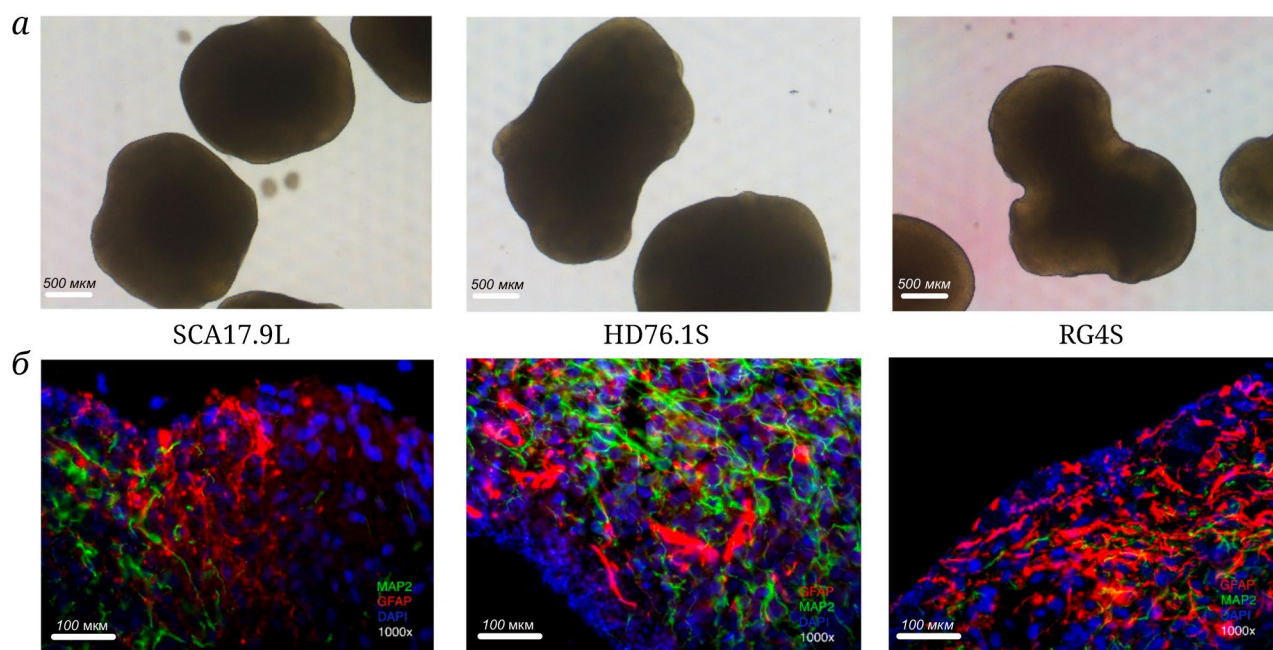


Рис. 1. Характеристики органоидов среднего мозга. а – Микрофотографии органоидов мозга с зонами морфогенеза после культивирования в среде для дифференцировки в миниреакторах в течение 45 дней; фазово-контрастная микроскопия (увеличение – 200×). б – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов органоидов мозга, полученных из дифференцированных производных различных линий ИПСК. Окрашка антителами на MAP (зеленый); окрашка антителами GFAP (красный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий); увеличение – 1000×. SCA17.9L – клеточная линия, содержащая 45 CAG-повторов в *TBP*; HD76.1S – клеточная линия, содержащая 76 CAG-повторов в *HTT*; RG4S – контрольная клеточная линия

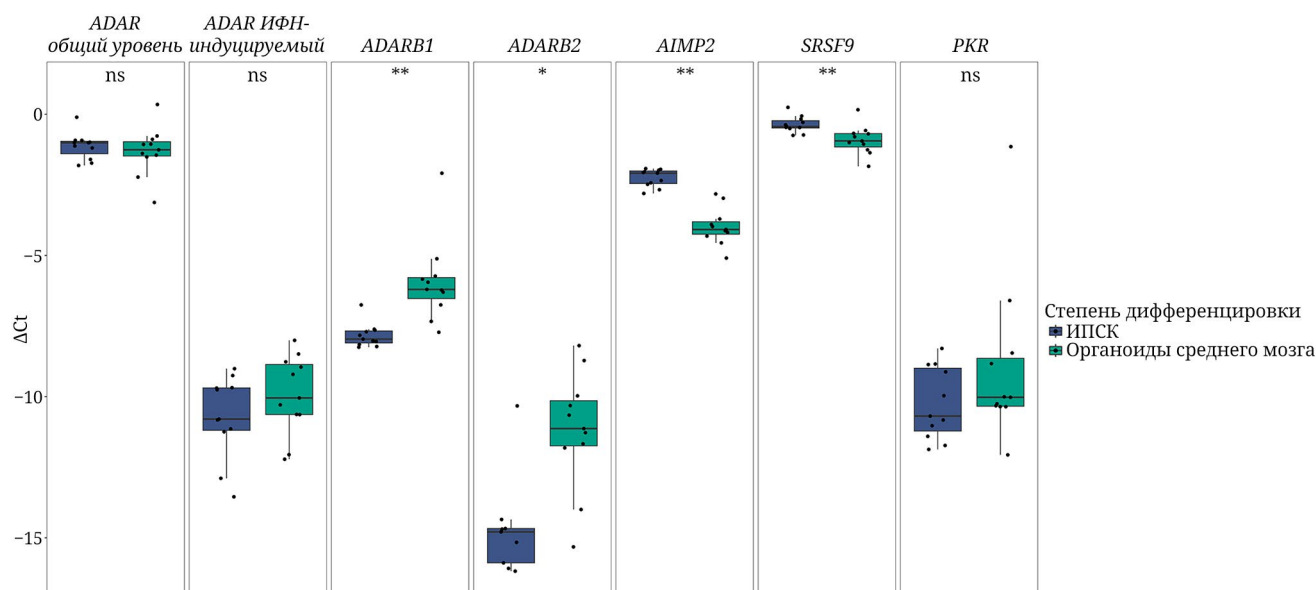


Рис. 2. Анализ дифференциальной экспрессии связанных с системой ADAR генов при сравнении ИПСК и органоидов среднего мозга. ΔC_t – разница между пороговым циклом исследуемого гена и средним геометрическим пороговых циклов *ACTB* и *TBP*; ИФН – интерферон; * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; ns – p -value > 0,05. Более подробно данные представлены в табл. ПЗБ в Приложении

Помимо этих сайтов, в данных также обнаружили дополнительные 44 сайта редактирования, отвечавшие использованным критериям фильтрации. Таким образом, после отбора анализировали 55 сайтов редактирования для ИПСК и 57 сайтов – для органоидов среднего мозга, при этом 48 сайтов были общими для обеих групп. Исследуемые сайты включали позиции РНК, редактируемые как отдельно ферментами ADAR1 или ADAR2, так и обоими совместно (табл. ПЗБ в Приложении). Для ряда тестируемых сайтов на данный момент не известны изоформы ADAR, которые их редактируют. Однако эти сайты расположены в Alu-повторах, из чего можно предположить, что их редактирует ADAR1 [27].

Изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты и регуляторы A→I редактирования РНК, и сопутствующий рост уровня редактирования при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в органоиды мозга. Дифференцировка ИПСК с образованием органоидов мозга моделирует процесс образования нервной ткани у эмбриона. В соответствии с этим следовало ожидать усиления A→I редактирования РНК за счет изоформы ADAR2 (ген *ADARB1*) [27]. Для интерпретации изменений в редактировании РНК, наблюдаемых посредством таргетной панели, оценивали экспрессию нескольких генов, имеющих прямое отношение к A→I редактированию, в рассматриваемых состояниях клеточных культур. Изменения в генной экспрессии оценивали во всех 10 обследуемых культурах независимо от патологии или ее от-

сутствия, поскольку все они претерпевали дифференцировку на морфологическом уровне.

Так, с дифференцировкой значительно возросла экспрессия генов *ADARB1* (фермент ADAR2) и *ADARB2* (неактивная каталитически изоформа ADAR3), что согласуется с представлениями о том, что экспрессия этих генов повышена в нейрональных тканях (рис. 2). Также наблюдали снижение экспрессии генов *AIMP2* и *SRSF9*, которые описаны как негативные регуляторы редактирования РНК [27, 60]. Предполагается, что продукт *AIMP2* снижает редактирование обоих ферментов ADAR, в то время как *SRSF9* подавляет ADAR2-опосредованное редактирование. Оценивали представленность мРНК гена *ADAR*, кодирующей как все изоформы (общий уровень), так и интерферон-индуцируемые изоформы. Как и ожидалось, количество мРНК ADAR (фермент ADAR1) оставалось на одном и том же уровне как в стволовых клетках, так и в органоидах (рис. 2; табл. ПЗБ в Приложении).

Затем сравнивали уровни редактирования каждого из исследованных сайтов РНК между ИПСК и органоидами мозга для всех 10 образцов безотносительно патологии для независимой оценки влияния дифференцировки (табл. ПЗ в Приложении). В соответствии с наблюдаемым увеличением экспрессии *ADARB1* и сниженной экспрессией *AIMP2* и *SRSF9* следовало ожидать повышение уровня редактирования сайтов, редактируемых ADAR2. Участки, редактируемые ADAR1, должны были оставаться на неизменном уровне редактирования. Большинство диф-

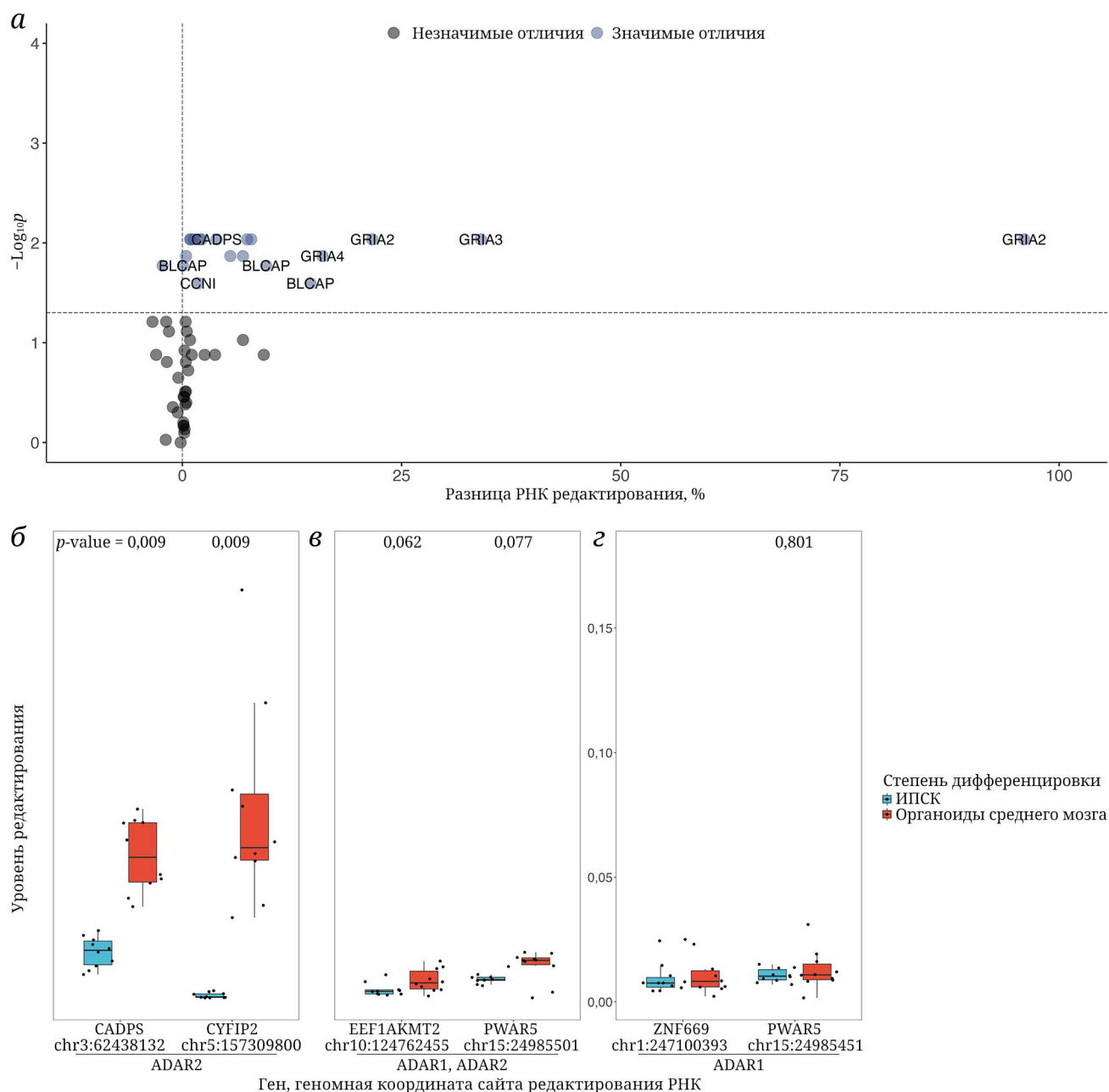


Рис. 3. Изменение уровня редактирования РНК после дифференцировки ИПСК в органоиды среднего мозга. **а** – Вулканная диаграмма анализа дифференциального редактирования между ИПСК и органоидами мозга; **б** – значимых изменений нет: сайты, предположительно, редактируемые ADAR1; **в** – рост на граничном уровне значимости: сайты, предположительно, редактируемые обоими ферментами ADAR; **г** – значимый рост: сайты-субстраты ADAR2, подтвержденные по независимым данным

ференциально редактируемых сайтов (с уровнем значимости $< 0,05$ по критерию Уилкоксона), по литературным данным, относилось к субстратам ADAR2 (рис. 3, а). Например, увеличивалось редактирование хорошо известных сайтов редактирования ADAR2 в составе мРНК кальций-зависимого активатора секреции 2 (CADPS) и взаимодействующего с FMR1 цитоплазматического белка 2 (CYFIP2) (рис. 3, б). Также наблюдали увеличение редактирования сайтов мРНК BLCAP, которые, по разным данным, редактиру-

ются обоими ферментами ADAR (подробную информацию по отдельным участкам см. в табл. 5 в Приложении).

Исследование дифференциального редактирования в модели дифференцировки ИПСК с образованием органоидов мозга может с некоторой долей уверенности определить, каким ферментом из двух активных изоформ редактируются те или иные сайты. Участки с выраженным повышением уровня редактирования ($p < 0,05$) представляют собой субстраты ADAR2 (рис. 3, б),

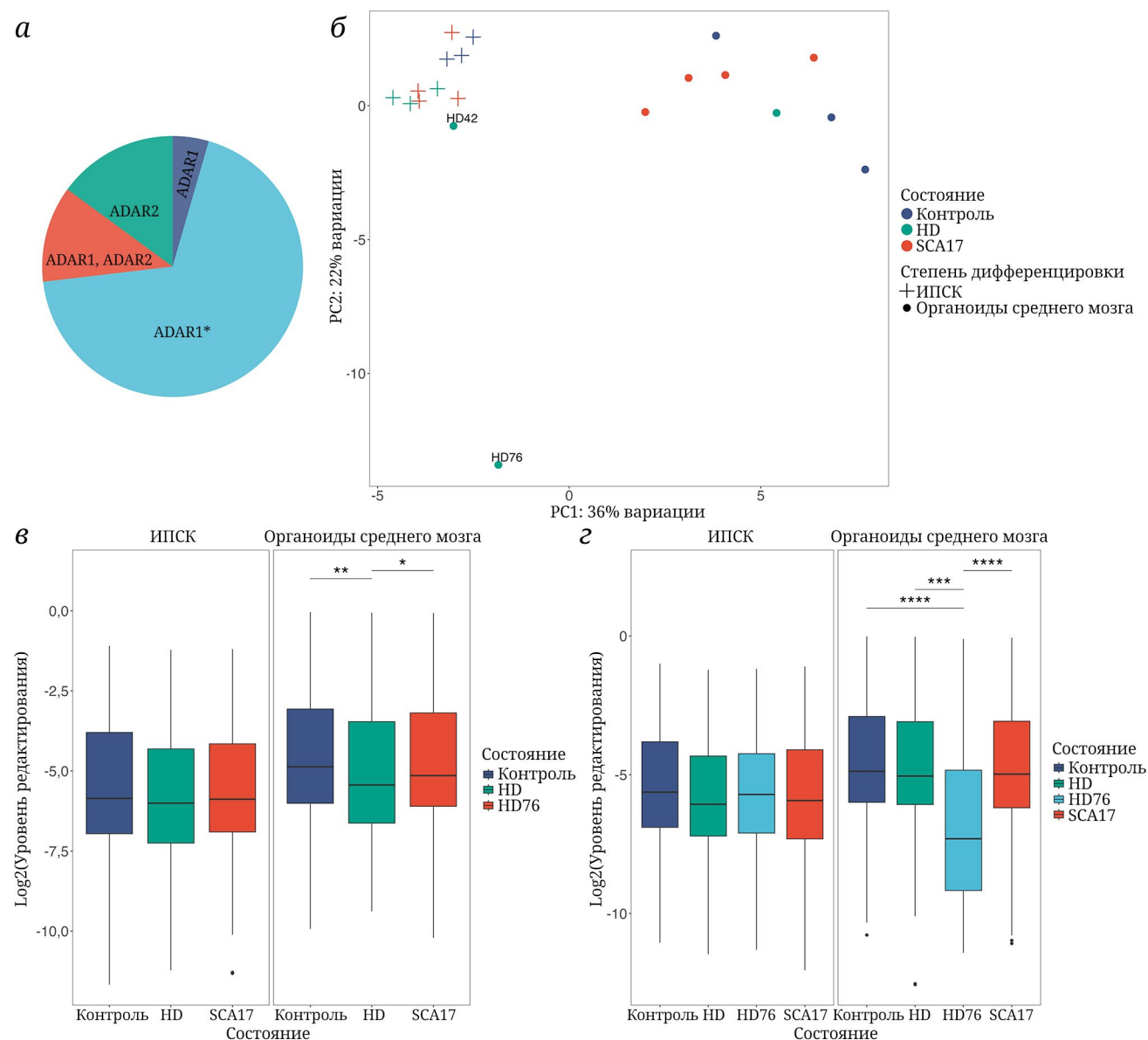


Рис. 4. Обзорный анализ редактирования РНК в исследованных образцах ИПСК и дифференцированных из них органоидах среднего мозга. **а** – Распределение сайтов, редактируемых разными ферментами ADAR (подробнее см. в табл. П2Б в Приложении); ADAR1* – сайты РНК в Alu- и SINE-повторах, предположительно, редактируемые ферментом ADAR1; **б** – анализ главных компонент, интегрирующий переменные – уровни редактирования исследуемых сайтов в патологии и контроле. Все образцы были разделены на две отдельные группы, включающие ИПСК и органоиды среднего мозга. Две культуры органоидов HD, содержащие 42 и 76 CAG-повторов, представляли собой выбросы; **в** и **г** – коробчатые диаграммы уровней редактирования РНК с включением HD76 в группу HD и с обособлением этого образца. ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; HD – болезнь Гентингтона; SCA17 – атаксия типа 17; HD76 – болезнь Гентингтона с 76 CAG-повторами в гене *HTT*; * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; *** p -value < 0,001; **** p -value < 0,0001

тогда как участки с тенденцией к повышению этого уровня (с уровнями значимости чуть ниже граничного значения), вероятно, редактируются одновременно двумя ферментами (рис. 3, в). Стабильно редактируемые сайты относятся к субстратам первой изоформы (рис. 3, г). Примечательно, что включенные в исследование РНК с Alu- и SINE-повторами, например днРНК *PWAR5* и *TROAP-AS1*, в основном аннотированы нами как субстраты

ADAR1. В литературе описано, что повторы такого типа с протяженными участками дцРНК как раз редактируются именно этой изоформой [17].

Таким образом, дифференцировка стволовых клеток в органоиды мозга представляла интересный альтернативный способ аннотации субстратов ADAR1 и ADAR2 в дополнение к экспериментам с нокаутами и нокдаунами соответствующих генов, что при расширении исследования

в масштабах транскриптома может использоваться в дальнейших работах.

A→I редактирование РНК в органоидах среднего мозга, полученных от пациентов, страдающих болезнями экспансии тринуклеотидных повторов. Анализ данных обеспечил разделение ИПСК и органоидов среднего мозга на основе их профилей редактирования РНК, включающих уровни редактирования всех сайтов, среди которых были субстраты ADAR1, ADAR2 и обоих ферментов (рис. 4, а и б; рис. П1 в Приложении). Метод главных компонент (PCA) более или менее четко разграничил ИПСК и органоиды на две отдельные группы. Исключением стали два образца мозговых органоидов, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона. Один образец, содержащий 76 CAG-повторов в гене *HTT* (HD76), оказался в стороне среди всех остальных, тогда как другой образец, содержащий 42 CAG-повтора в гене *HTT* (HD42), демонстрировал большее сходство с группой из ИПСК. Следует предполагать, что последний образец органоидов характеризовался неполной дифференцировкой и сохранял ряд черт ИПСК, из которых он происходил.

Mehta et al. [61] ранее сообщали об изменениях в транскриптомах и морфологических особенностях нейронов коры головного мозга, полученных из ИПСК пациентов с HD. В соответствии с этим мы наблюдали более низкий уровень редактирования РНК, выраженный в виде медианы редактирования всех исследованных сайтов, и более узкие межквартильные интервалы в ИПСК и органоидах, полученных от пациентов с HD и SCA17, по сравнению с контролем (рис. 4, в). Редактирование РНК органоидов среднего мозга у пациентов с HD значительно отличалось от такового у пациентов с SCA17 и здоровых доноров (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$).

Данные также проанализировали, вынеся в отдельную группу образец органоидов среднего мозга, содержащий 76 CAG-повторов в гене *HTT*. Редактирование РНК HD76 значительно отличалось от органоидов среднего мозга, полученных от здоровых доноров, пациентов с SCA17 и остальных пациентов с HD (рис. 4, г; U-критерий Манна–Уитни; значение $p < 0,05$). Образец с такой значительной экспансией повторов выделялся не только по уровню редактирования РНК. Анализ экспрессии генов, связанных с системой ферментов ADAR, выявил, в частности, более чем 1000-кратное увеличение экспрессии протеинкиназы R (PKR) в образце органоидов HD76 по сравнению с соответствующими ИПСК. Другие образцы не характеризовались такими существенными отличиями в экспрессии каких-либо генов из проанализированного списка (табл. ПЗВ в Приложении). Этот результат согласуется с предыдущими

исследованиями, которые выявили наличие воспаления и высокую экспрессию PKR при CAG-заболеваниях и заболеваниях, связанных с экспансией повторов CUG [62]. Кроме того, PKR может связываться с CAG-трактом, и эта способность становится более выраженной по мере увеличения длины тракта [31]. Примечательно, что аномалии альтернативного сплайсинга были обнаружены в клетках, содержащих 69 и 74 повтора CAG в гентингтине, но отсутствовали в образцах с 44–46 такими повторами [63]. Нарушения сплайсинга, в свою очередь, могут напрямую вызывать активацию PKR за счет участков дцРНК, образующихся за счет удержанных интронов [64]. Помимо PKR, в образце HD76 также наблюдали 72-кратное увеличение экспрессии гена *ADARB1*, кодирующего изоформу ADAR2. В свете высказанной гипотезы о влиянии дополнительных повторов на активность ADAR это увеличение может иметь компенсаторный характер, поскольку нормальное количество фермента ингибировано избытком двухцепочечной РНК в транскриптах гентингтина.

В совокупности эти данные подтверждают представление о том, что после дифференцировки ИПСК в органоиды мозга значимо меняется профиль редактирования РНК [65]. Также отметим значительное снижение уровня редактирования РНК в органоидах среднего мозга от пациента с 76 CAG-повторами в гене *HTT*.

Длинная некодирующая РНК PWAR5 обогащена сайтами, редактирование которых снижено в патологии. После анализа изменений редактирования РНК, сопровождающих дифференцировку ИПСК в органоиды среднего мозга, идентифицировали дифференциально редактируемые сайты РНК между клетками, несущими нормальное количество CAG-повторов, и клетками с патологическим количеством повторов. Сайты РНК проверяли на дифференциальное редактирование попарно для каждого заболевания, отдельно в ИПСК и в органоидах мозга, с использованием функции REDIT LLR [57]. В ИПСК не наблюдали дифференциально редактируемых сайтов ни в одной из групп (табл. 1; подробнее – рис. П2 и табл. П6А–П6В в Приложении). Напротив, мы наблюдали, что органоиды среднего мозга HD76 в соответствии с указанными выше результатами оказались обогащены дифференциально отредактированными сайтами (табл. 1; рис. 5; подробнее – табл. П6Г–П6Е в Приложении). Мы обнаружили 25, 28 и 16 дифференциально редактируемых сайтов, когда сравнивали органоиды среднего мозга HD76 с контролем, SCA17 и другими образцами HD соответственно. Кроме того, мы обнаружили по 5 дифференциально редактируемых сайтов при сравнении органоидов, содержащих менее 47 CAG-повторов в гене *HTT*,

с контролем и SCA17 (табл. 1; подробнее – рис. ПЗ и табл. П6Ж–П6З в Приложении). В то же время редактирование РНК в органоидах пациентов с атаксией типа 17 не отличалось от контроля (рис. ПЗВ и табл. П6И в Приложении). Важно отметить, что редактирование РНК большинства дифференциально редактируемых сайтов в патологии было снижено.

Большинство дифференциально редактируемых сайтов были расположены в некодирующих областях (рис. П4А в Приложении), а длинная некодирующая РНК (днРНК) *PWAR5* была обогащена сайтами со значительно пониженным редактированием (рис. П4Б). *PWAR5* представляет собой днРНК, связанную с тяжелым воспалительным синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана. Эта РНК располагается в гене *SNHG14*, который содержит более 1000 сайтов А→I редактирования [66]. Ген *SNHG14* содержит кластеры малых ядрышковых РНК бокса C/D (snoRNA) и перекрывается с несколькими днРНК, ассоциированными с синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана (*PWAR*) [67]. Более того, повышенная экспрессия этого гена связана с болезнью Паркинсона [68], и высокая плотность сайтов редактирования была зарегистрирована для *SNHG14* при шизофрении [69]. Другой ген, расположенный в этой области, *SNORD115*, связан с синдромом Прадера–Вилли и Ангельмана и, как было показано, уменьшает редактирование, опосредованное ADAR2 [70], в частности, в сайтах глутаматного рецептора *GRIA2* – канонической мишени этой изоформы фермента.

В соответствии с уже описанными свойствами образца HD76 его органоиды демонстрировали значительное снижение редактирования РНК. Более того, большинство сайтов *PWAR5* в этих

Таблица 1. Число дифференциально редактируемых сайтов РНК в группах патологии в исследованных генах

Гены	Органоиды среднего мозга				
	HD76/ контроль	HD76/ SCA17	HD76/ HD	HD/ контроль	HD/ SCA17
<i>BLCAP</i>	3	3	3	0	0
<i>FLNB</i>	1	1	0	0	0
<i>GRIA2</i>	0	0	1	0	1
<i>GRIA3</i>	0	1	1	0	0
<i>PWAR5</i>	19	20	9	5	4
<i>ZNF669</i>	2	3	2	0	0
Всего	25	28	16	5	9

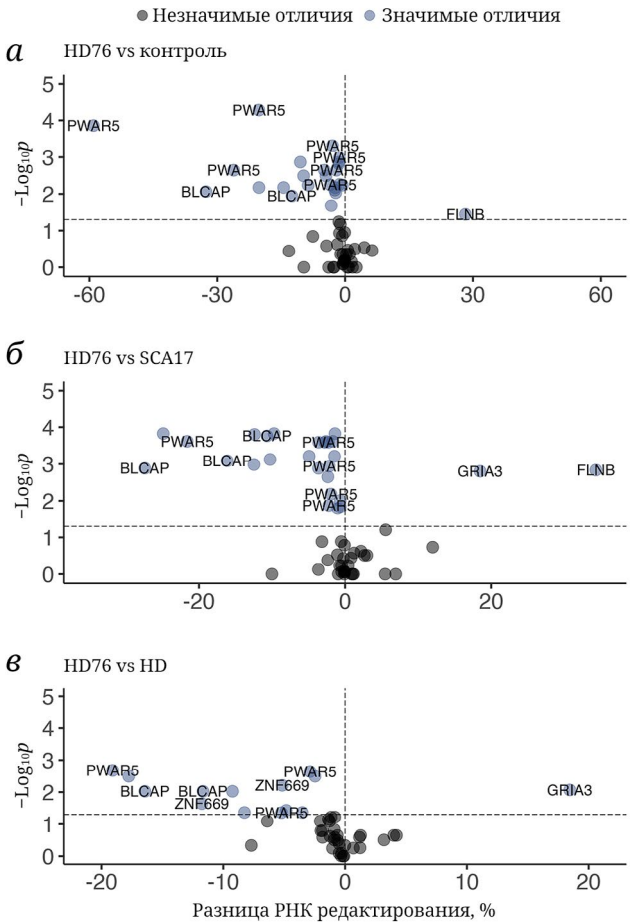


Рис. 5. Вулканские диаграммы анализа дифференциального редактирования органоидов среднего мозга, содержащих 76 повторов CAG в гене *HTT* (HD76). Сравнение органоидов HD76 с органоидами от здоровых доноров (а), от пациентов с SCA17 (б) и с другими двумя случаями болезни Гентингтона. Синими точками отмечены сайты со значимыми (скорректированное p -value < 0,05) изменениями уровня редактирования. Ось X представляет разницу в уровне редактирования РНК (%); ось Y отражает $\log_{10}p$ -value (скорректированное)

органоидах среднего мозга не редактировалось (рис. 6). В то же время эта тенденция не наблюдалась в соответствующих ИПСК (рис. 4, г; рис. 6). Сниженное редактирование РНК в наших экспериментах нельзя объяснить дифференциальной экспрессией ферментов ADAR, поскольку мы не наблюдали каких-либо различий в экспрессиях ADAR1, ADAR2 и ADAR3, а также SRSF9 и AIMP2 между патологиями (табл. ПЗВ в Приложении).

Помимо днРНК *PWAR5*, несколько дифференциально редактируемых сайтов находились в мРНК генов *BLCAP* и *ZNF669* (рис. П4Б в Приложении). Известно, что мРНК *BLCAP* является мишенью как для ADAR1, так и для ADAR2 [71]. До настоящего времени не было известно, субстратом какого фермента служат мРНК *ZNF669* и днРНК *PWAR5*. По нашим предположениям,

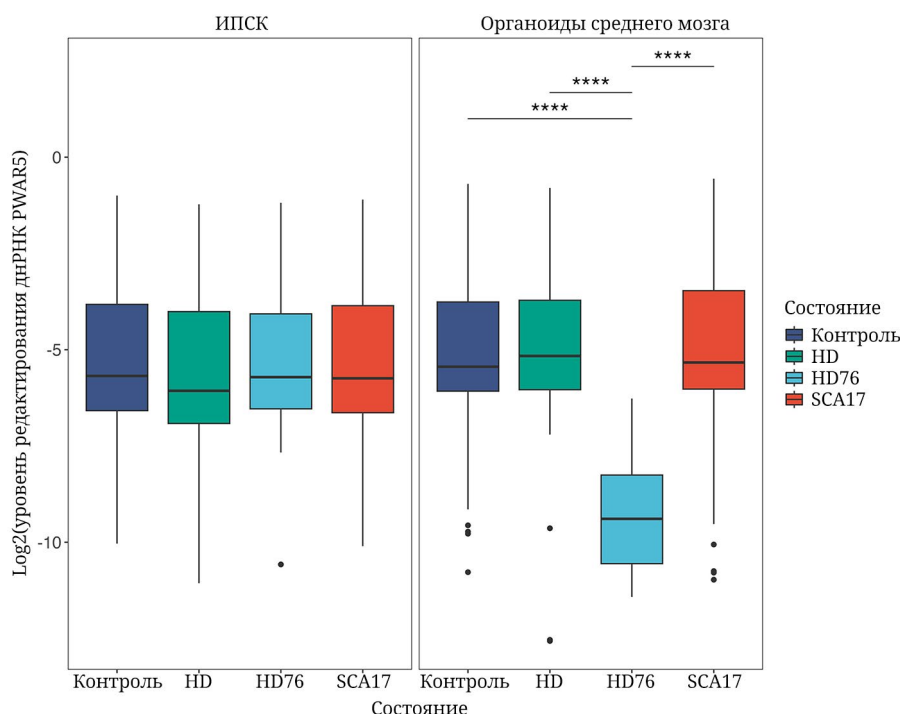


Рис. 6. Уровни редактирования сайтов длинной некодирующей РНК *PWAR5*; HD – болезнь Гентингтона; SCA17 – атаксия типа 17; HD76 – болезнь Гентингтона с 76 CAG-повторами в гене *HTT*; **** p -value < 0,0001

некоторые участки на этих РНК могут редактироваться обеими изоформами, а некоторые – только ADAR1 (табл. П5 в Приложении). Из этих данных можно предполагать, что избыточные CAG-повторы в образце HD76 способны снижать активность обеих изоформ ADAR.

Редактирование сайта мРНК *GRIA2*, кодирующее аминокислотную замену Q607R, превышало 95% практически во всех выборках, что согласуется с предыдущими данными о редактировании этого канонического участка [72]. Однако небольшое снижение редактирования этого сайта опять же наблюдали в органоидах HD76 (92,7%). Подобное снижение редактирования этого сайта ранее описано в полосатом теле и префронтальной коре пациентов с HD, а также в префронтальной коре пациентов с болезнью Альцгеймера [73], в мотонейронах при боковом амиотрофическом склерозе [74]. Понижение уровня регуляции этого сайта редактирования *GRIA2* приводит к эксайто-токсичности, опосредованной глутаматом [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование A→I редактирования выбранных участков некоторых описанных ранее в этом контексте РНК в клеточных моделях болезней экспансии тринуклеотидных CAG-повторов (спиноцереbellарной атаксии 17 и болезни Гентингтона) было направлено на проверку гипотезы о

том, что такие повторы, склонные к образованию двухцепочечных структур, могут отвлекать на себя ферменты ADAR, понижая общий уровень редактирования РНК. Потенциально, в частности, в случае снижения активности ADAR1, имеющей в целом противовоспалительный эффект, это могло бы вносить вклад в патогенез заболеваний.

Помимо сравнения между собой клеточных линий от пациентов с патологиями, A→I редактирование РНК оценивали в модели дифференцировки из ИПСК в органоиды среднего мозга. Таким образом, имелись группы контроля и патологии в двух вариантах – ИПСК и органоидов. В соответствии с имеющимися представлениями во всех образцах, кроме одного, дифференцировка в органоиды приводила к повышению уровня редактирования РНК на имеющейся выборке. Анализ экспрессии относящихся к системе A→I редактирования РНК генов показал, что изоформы ADAR1 сохраняют стабильный уровень экспрессии при дифференцировке от стволовых клеток в мозговые органоиды, а ADAR2 демонстрирует значительное повышение уровня. Это означает, что дифференцировка в культуре предоставляет неплохой инструмент для оценки, каким из ферментов, ADAR1 или ADAR2, редактируется тот или иной сайт. Если по результатам анализа в предложенной здесь таргетной панели уровень редактирования значимо возрастал с дифференцировкой, то эти сайты, очевидно, редактировались ферментом ADAR2. Результаты такого анализа

в целом совпадали с литературными данными, что подтверждает уместность представленного подхода.

В ИПСК значимых различий между нормой и патологией в каких-либо из исследованных сайтов не обнаружили. В органоидах среднего мозга глобальных изменений редактирования РНК также не наблюдали. На общем фоне одна культура представляла собой существенный выброс. Она была получена от пациента с болезнью Гентингтона при высоком уровне CAG-повторов в гене гентингтина (76 по сравнению с 42–46 CAG-повторами в остальных образцах патологии). Именно этот образец в некоторой мере подтверждал сделанное нами предположение, поскольку характеризовался значительно сниженным уровнем A→I редактирования в исследуемых участках. Разумеется, наличие всего одного подобного образца ограничивает универсальность сделанных нами выводов, при том что пациенты с таким значительным числом повторов доступны крайне редко. Несмотря на то что на большей части образцов гипотеза не подтвердилась, полученный результат указывает направление дальнейших исследований, а именно более четкое определение числа CAG-повторов, способного прямо или косвенно повлиять на A→I редактирование, а также выяснение роли этого процесса в развитии нейропатологии. Такие результаты могут лечь в основу подходов к модулированию редактирования РНК для лечения болезней экспансии повторов.

Вклад авторов. М.А. Лагарькова, С.А. Мошковский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, В.В. Кудрявский – концепция и управление работой;

А.В. Еремеев, Е.С. Ручко, М.А. Лагарькова, А.Н. Богомазова – получение ИПСК и органоидов среднего мозга; В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров – ПЦР и количественная ПЦР; В.В. Кудрявский, В.А. Веселовский – подготовка библиотек для секвенирования РНК; В.А. Веселовский, К.М. Климина – секвенирование РНК; В.В. Кудрявский – анализ данных, подготовка иллюстраций; В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, С.А. Мошковский – обсуждение результатов исследования; В.В. Кудрявский – подготовка текста; С.А. Мошковский, В.В. Кудрявский, А.О. Гончаров, А.А. Ключникова, М.А. Лагарькова, А.Н. Богомазова, К.М. Климина – редактирование текста статьи. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Благодарности. Авторы благодарны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, который предоставил оборудование для выполнения секвенирования РНК.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00105).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saudou, F., and Humbert, S. (2016) The biology of huntingtin, *Neuron*, **89**, 910-926, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>.
2. Bogomazova, A. N., Eremeev, A. V., Pozmogova, G. E., and Lagarkova, M. A. (2019) The role of mutant RNA in the pathogenesis of Huntington's disease and other polyglutamine diseases, *Mol. Biol. (Mosk)*, **53**, 954-967, <https://doi.org/10.1134/S0026893319060037>.
3. Walker, F. O. (2007) Huntington's disease, *Lancet*, **369**, 218-228, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1).
4. Saito, R., Tada, Y., Oikawa, D., Sato, Y., Seto, M., Satoh, A., Kume, K., Ueki, N., Nakashima, M., Hayashi, S., Toyoshima, Y., Tokunaga, F., Kawakami, H., and Kakita, A. (2022) Spinocerebellar ataxia type 17-digenic TBP/STUB1 disease: neuropathologic features of an autopsied patient, *Acta Neuropathol. Commun.*, **10**, 177, <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01486-6>.
5. Cortes, C. J., and La Spada, A. R. (2015) Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Mol. Cell. Neurosci.*, **66**, 53-61, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.010>.
6. Adegbiyuro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W., Groover, S., and Legleiter, J. (2017) Proteins containing expanded polyglutamine tracts and neurodegenerative disease, *Biochemistry*, **56**, 1199-1217, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00936>.
7. Srivastava, A. K., Takkar, A., Garg, A., and Faruq, M. (2017) Clinical behaviour of spinocerebellar ataxia type 12 and intermediate length abnormal CAG repeats in PPP2R2B, *Brain*, **140**, 27-36, <https://doi.org/10.1093/brain/aww269>.

8. Wright, G. E. B., Collins, J. A., Kay, C., McDonald, C., Dolzhenko, E., Xia, Q., Bečanović, K., Drögemöller, B. I., Semaka, A., Nguyen, C. M., Trost, B., Richards, F., Bijlsma, E. K., Squitieri, F., Ross, C. J. D., Scherer, S. W., Eberle, M. A., Yuen, R. K. C., and Hayden, M. R. (2019) Length of uninterrupted CAG, independent of polyglutamine size, results in increased somatic instability, hastening onset of huntington disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **104**, 1116-1126, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.007>.
9. Li, L.-B., Yu, Z., Teng, X., and Bonini, N. M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*, *Nature*, **453**, 1107-1111, <https://doi.org/10.1038/nature06909>.
10. Wang, L.-C., Chen, K.-Y., Pan, H., Wu, C.-C., Chen, P.-H., Liao, Y.-T., Li, C., Huang, M.-L., and Hsiao, K.-M. (2011) Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1255-1267, <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0522-4>.
11. Hsu, R.-J., Hsiao, K.-M., Lin, M.-J., Li, C.-Y., Wang, L.-C., Chen, L.-K., and Pan, H. (2011) Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice, *PLoS One*, **6**, e16417, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016417>.
12. Barbon, A., and Barlati, S. (2011) Glutamate receptor RNA editing in health and disease, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 882-889, <https://doi.org/10.1134/S0006297911080037>.
13. Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA, *Cell*, **46**, 819-826, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90063-2).
14. Wolf, P. G., Rowe, C. A., and Hasebe, M. (2004) High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*, *Gene*, **339**, 89-97, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.018>.
15. Solomon, O., Oren, S., Safran, M., Deshet-Unger, N., Akiva, P., Jacob-Hirsch, J., Cesarkas, K., Kabesa, R., Amariglio, N., Unger, R., Rechavi, G., and Eyal, E. (2013) Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR), *RNA*, **19**, 591-604, <https://doi.org/10.1261/rna.038042.112>.
16. Bass, B. L., and Weintraub, H. (1988) An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate, *Cell*, **55**, 1089-1098, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90253-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90253-X).
17. Thomas, J. M., and Beal, P. A. (2017) How do ADARs bind RNA? New protein-RNA structures illuminate substrate recognition by the RNA editing ADARs, *Bioessays*, **39**, 1600187, <https://doi.org/10.1002/bies.201600187>.
18. Goncharov, A. O., Shender, V. O., Kuznetsova, K. G., Kliuchnikova, A. A., and Moshkovskii, S. A. (2022) Interplay between A-to-I editing and splicing of RNA: a potential point of application for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5240, <https://doi.org/10.3390/ijms23095240>.
19. Maurano, M., Snyder, J. M., Connelly, C., Henao-Mejia, J., Sidrauski, C., and Stetson, D. B. (2021) Protein kinase R and the integrated stress response drive immunopathology caused by mutations in the RNA deaminase ADAR1, *Immunity*, **54**, 1948-1960.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.001>.
20. Liddicoat, B. J., Piskol, R., Chalk, A. M., Ramaswami, G., Higuchi, M., Hartner, J. C., Li, J. B., Seeburg, P. H., and Walkley, C. R. (2015) RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself, *Science*, **349**, 1115-1120, <https://doi.org/10.1126/science.aac7049>.
21. Behm, M., and Öhman, M. (2016) RNA editing: a contributor to neuronal dynamics in the mammalian brain, *Trends Genet.*, **32**, 165-175, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.005>.
22. Vissel, B., Royle, G. A., Christie, B. R., Schiffer, H. H., Ghetti, A., Tritto, T., Perez-Otano, I., Radcliffe, R. A., Seamans, J., Sejnowski, T., Wehner, J. M., Collins, A. C., O'Gorman, S., and Heinemann, S. F. (2001) The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures, *Neuron*, **29**, 217-227, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00192-1).
23. Egebjerg, J., and Heinemann, S. F. (1993) Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 755-759, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.755>.
24. Rice, G. I., Kasher, P. R., Forte, G. M. A., Mannion, N. M., Greenwood, S. M., Szykiewicz, M., Dickerson, J. E., Bhaskar, S. S., Zampini, M., Briggs, T. A., Jenkinson, E. M., Bacino, C. A., Battini, R., Bertini, E., Brogan, P. A., Brueton, L. A., Carpanelli, M., De Laet, C., de Lonlay, P., del Toro, M., Desguerre, I., Fazzi, E., Garcia-Cazorla, A., Heiberg, A., Kawaguchi, M., Kumar, R., Lin, J.-P. S.-M., Lourenco, C. M., Male, A. M., Marques, W., Mignot, C., Olivieri, I., Orcesi, S., Prabhakar, P., Rasmussen, M., Robinson, R. A., Rozenberg, F., Schmidt, J. L., Steindl, K., Tan, T. Y., van der Merwe, W. G., Vanderver, A., Vassallo, G., Wakeling, E. L., Wassmer, E., Whittaker, E., Livingston, J. H., Lebon, P., Suzuki, T., McLaughlin, P. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A., Lovell, S. C., and Crow, Y. J. (2012) Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature, *Nat. Genet.*, **44**, 1243-1248, <https://doi.org/10.1038/ng.2414>.
25. Livingston, J. H., Lin, J.-P., Dale, R. C., Gill, D., Brogan, P., Munnich, A., Kurian, M. A., Gonzalez-Martinez, V., De Goede, C. G. E. L., Falconer, A., Forte, G., Jenkinson, E. M., Kasher, P. R., Szykiewicz, M., Rice, G. I.,

- and Crow, Y. J. (2014) A type I interferon signature identifies bilateral striatal necrosis due to mutations in ADAR1, *J. Med. Genet.*, **51**, 76-82, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102038>.
26. Huntley, M. A., Lou, M., Goldstein, L. D., Lawrence, M., Dijkgraaf, G. J. P., Kaminker, J. S., and Gentleman, R. (2016) Complex regulation of ADAR-mediated RNA-editing across tissues, *BMC Genomics*, **17**, 61, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2291-9>.
 27. Tan, M. H., Li, Q., Shanmugam, R., Piskol, R., Kohler, J., Young, A. N., Liu, K. I., Zhang, R., Ramaswami, G., Ariyoshi, K., Gupte, A., Keegan, L. P., George, C. X., Ramu, A., Huang, N., Pollina, E. A., Leeman, D. S., Rustighi, A., Goh, Y. P. S., GTEx Consortium, Chawla, A., Del Sal, G., Peltz, G., Brunet, A., Conrad, D. F., Samuel, C. E., O'Connell, M. A., Walkley, C. R., Nishikura, K., and Li, J. B. (2017) Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals, *Nature*, **550**, 249-254, <https://doi.org/10.1038/nature24041>.
 28. Filippini, A., Bonini, D., Lacoux, C., Pacini, L., Zingariello, M., Sancillo, L., Bosisio, D., Salvi, V., Mingardi, J., La Via, L., Zalfa, F., Bagni, C., and Barbon, A. (2017) Absence of the Fragile X Mental Retardation Protein results in defects of RNA editing of neuronal mRNAs in mouse, *RNA Biol.*, **14**, 1580-1591, <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1338232>.
 29. Kubota-Sakashita, M., Iwamoto, K., Bundo, M., and Kato, T. (2014) A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia, *Mol. Brain*, **7**, 5, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-5>.
 30. Srivastava, P. K., Bagnati, M., Delahaye-Duriez, A., Ko, J.-H., Rotival, M., Langley, S. R., Shkura, K., Mazzuferi, M., Danis, B., van Eyll, J., Foerch, P., Behmoaras, J., Kaminski, R. M., Petretto, E., and Johnson, M. R. (2017) Genome-wide analysis of differential RNA editing in epilepsy, *Genome Res.*, **27**, 440-450, <https://doi.org/10.1101/gr.210740.116>.
 31. Peel, A. L., Rao, R. V., Cottrell, B. A., Hayden, M. R., Ellerby, L. M., and Bredesen, D. E. (2001) Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, binds preferentially to Huntington's disease (HD) transcripts and is activated in HD tissue, *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1531-1538, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.15.1531>.
 32. Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., and Krzyzosiak, W. J. (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets, *Mol. Cell*, **25**, 575-586, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.031>.
 33. Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B.-E., Ariyoshi, K., Iizasa, H., Davuluri, R. V., and Nishikura, K. (2013) ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing, *Cell*, **153**, 575-589, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.024>.
 34. Khan, N., Kolimi, N., and Rathinavelan, T. (2015) Twisting right to left: A...A mismatch in a CAG trinucleotide repeat overexpansion provokes left-handed Z-DNA conformation, *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004162, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004162>.
 35. Echeverria, G. V., and Cooper, T. A. (2012) RNA-binding proteins in microsatellite expansion disorders: mediators of RNA toxicity, *Brain Res.*, **1462**, 100-111, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.030>.
 36. Donnelly, C. J., Zhang, P.-W., Pham, J. T., Haeusler, A. R., Mistry, N. A., Vidsensky, S., Daley, E. L., Poth, E. M., Hoover, B., Fines, D. M., Maragakis, N., Tienari, P. J., Petrucelli, L., Traynor, B. J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C. F., Blackshaw, S., Sattler, R., and Rothstein, J. D. (2013) RNA toxicity from the ALS/FTD C9orf72 expansion is mitigated by antisense intervention, *Neuron*, **80**, 415-428, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.015>.
 37. Mahajan, S. S., and Ziff, E. B. (2007) Novel toxicity of the unedited GluR2 AMPA receptor subunit dependent on surface trafficking and increased Ca²⁺-permeability, *Mol. Cell. Neurosci.*, **35**, 470-481, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.04.006>.
 38. Hideyama, T., Yamashita, T., Suzuki, T., Tsuji, S., Higuchi, M., Seeburg, P. H., Takahashi, R., Misawa, H., and Kwak, S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2, *J. Neurosci.*, **30**, 11917-11925, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010>.
 39. Moore, S., Alsop, E., Lorenzini, I., Starr, A., Rabichow, B. E., Mendez, E., Levy, J. L., Burciu, C., Reiman, R., Chew, J., Belzil, V. V., W Dickson, D., Robertson, J., Staats, K. A., Ichida, J. K., Petrucelli, L., Van Keuren-Jensen, K., and Sattler, R. (2019) ADAR2 mislocalization and widespread RNA editing aberrations in C9orf72-mediated ALS/FTD, *Acta Neuropathol.*, **138**, 49-65, <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01999-w>.
 40. Riedmann, E. M., Schopoff, S., Hartner, J. C., and Jantsch, M. F. (2008) Specificity of ADAR-mediated RNA editing in newly identified targets, *RNA*, **14**, 1110-1118, <https://doi.org/10.1261/rna.923308>.
 41. Herbert, A., and Rich, A. (2001) The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the *in vivo* editing of minimal substrates by ADAR1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12132-12137, <https://doi.org/10.1073/pnas.211419898>.
 42. Franklin, A., Steele, E. J., and Lindley, R. A. (2020) A proposed reverse transcription mechanism for (CAG)_n and similar expandable repeats that cause neurological and other diseases, *Heliyon*, **6**, e03258, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03258>.

43. Shuvalova, L. D., Davidenko, A. V., Ereemeev, A. V., Khomyakova, E. A., Zerkalenkova, E. A., Lebedeva, O. S., Bogomazova, A. N., Klyushnikov, S. A., Illarioshkin, S. N., and Lagarkova, M. A. (2021) Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi008-A derived from patient with spinocerebellar ataxia 17, *Stem Cell Res.*, **54**, 102431, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102431>.
44. Holmqvist, S., Lehtonen, Š., Chumarina, M., Puttonen, K. A., Azevedo, C., Lebedeva, O., Ruponen, M., Oksanen, M., Djelloul, M., Collin, A., Goldwurm, S., Meyer, M., Lagarkova, M., Kiselev, S., Koistinaho, J., and Roybon, L. (2016) Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients, *NPJ Parkinsons Disease*, **2**, 16009, <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.9>.
45. Ereemeev, A. V., Volovikov, E. A., Shuvalova, L. D., Davidenko, A. V., Khomyakova, E. A., Bogomiakova, M. E., Lebedeva, O. S., Zubkova, O. A., and Lagarkova, M. A. (2019) “Necessity is the mother of invention” or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 321-328, <https://doi.org/10.1134/S0006297919030143>.
46. Levitsky, L. I., Kliuchnikova, A. A., Kuznetsova, K. G., Karpov, D. S., Ivanov, M. V., Pyatnitskiy, M. A., Kalinina, O. V., Gorshkov, M. V., and Moshkovskii, S. A. (2019) Adenosine-to-inosine RNA editing in mouse and human brain proteomes, *Proteomics*, **19**, e1900195, <https://doi.org/10.1002/pmic.201900195>.
47. Levitsky, L. I., Ivanov, M. V., Goncharov, A. O., Kliuchnikova, A. A., Bubis, J. A., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Pyatnitskiy, M. A., Ovchinnikov, R. K., Kukharsky, M. S., Farafonova, T. E., Novikova, S. E., Zgoda, V. G., Tarasova, I. A., Gorshkov, M. V., and Moshkovskii, S. A. (2023) Massive proteogenomic reanalysis of publicly available proteomic datasets of human tissues in search for protein recoding via adenosine-to-inosine RNA editing, *J. Proteome Res.*, **22**, 1695-1711, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00740>.
48. Nikitina, A. S., Lipatova, A. V., Goncharov, A. O., Kliuchnikova, A. A., Pyatnitskiy, M. A., Kuznetsova, K. G., Hamad, A., Vorobyev, P. O., Alekseeva, O. N., Mahmoud, M., Shakiba, Y., Anufrieva, K. S., Arapidi, G. P., Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Gorshkov, M. V., Chumakov, P. M., and Moshkovskii, S. A. (2022) Multiomic profiling identified EGF receptor signaling as a potential inhibitor of type I interferon response in models of oncolytic therapy by vesicular stomatitis virus, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5244, <https://doi.org/10.3390/ijms23095244>.
49. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
50. O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V. S., Kodali, V. K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K. M., Murphy, M. R., O’Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S. H., Rausch, D., Riddick, L. D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S. S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R. E., Vatsan, A. R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M. J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T. D., and Pruitt, K. D. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation, *Nucleic Acids Res.*, **44**, D733-D745, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.
51. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., and Peek, A. S. (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W163-W169, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>.
52. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, **34**, i884-i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
53. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
54. Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., and Li, H. (2021) Twelve years of SAMtools and BCFtools, *Gigascience*, **10**, giab008, <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>.
55. Picardi, E., and Pesole, G. (2013) REDIttools: high-throughput RNA editing detection made easy, *Bioinformatics*, **29**, 1813-1814, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt287>.
56. Picardi, E., D’Erchia, A. M., Lo Giudice, C., and Pesole, G. (2017) REDiportal: a comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D750-D757, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw767>.
57. Tran, S. S., Zhou, Q., and Xiao, X. (2020) Statistical inference of differential RNA-editing sites from RNA-sequencing data by hierarchical modeling, *Bioinformatics*, **36**, 2796-2804, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa066>.

58. Bahn, J. H., Lee, J.-H., Li, G., Greer, C., Peng, G., and Xiao, X. (2012) Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing, *Genome Res.*, **22**, 142-150, <https://doi.org/10.1101/gr.124107.111>.
59. Morabito, M. V., Ulbricht, R. J., O'Neil, R. T., Airey, D. C., Lu, P., Zhang, B., Wang, L., and Emeson, R. B. (2010) High-throughput multiplexed transcript analysis yields enhanced resolution of 5-hydroxytryptamine 2C receptor mRNA editing profiles, *Mol. Pharmacol.*, **77**, 895-902, <https://doi.org/10.1124/mol.109.061903>.
60. Shanmugam, R., Zhang, F., Srinivasan, H., Charles Richard, J. L., Liu, K. I., Zhang, X., Woo, C. W. A., Chua, Z. H. M., Buschdorf, J. P., Meaney, M. J., and Tan, M. H. (2018) SRSF9 selectively represses ADAR2-mediated editing of brain-specific sites in primates, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7379-7395, <https://doi.org/10.1093/nar/gky615>.
61. Mehta, S. R., Tom, C. M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P. P., Tang, J., and Mattis, V. B. (2018) Human Huntington's disease iPSC-derived cortical neurons display altered transcriptomics, morphology, and maturation, *Cell Rep.*, **25**, 1081-1096.e6, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.076>.
62. Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., and Thornton, C. A. (2000) Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR, *RNA*, **6**, 79-87, <https://doi.org/10.1017/S1355838200991544>.
63. Mykowska, A., Sobczak, K., Wojciechowska, M., Kozlowski, P., and Krzyzosiak, W. J. (2011) CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8938-8951, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr608>.
64. Bowling, E. A., Wang, J. H., Gong, F., Wu, W., Neill, N. J., Kim, I. S., Tyagi, S., Orellana, M., Kurley, S. J., Dominguez-Vidaña, R., Chung, H.-C., Hsu, T. Y.-T., Dubrulle, J., Saltzman, A. B., Li, H., Meena, J. K., Canlas, G. M., Chamakuri, S., Singh, S., Simon, L. M., Olson, C. M., Dobrolecki, L. E., Lewis, M. T., Zhang, B., Golding, I., Rosen, J. M., Young, D. W., Malovannaya, A., Stossi, F., Miles, G., Ellis, M. J., Yu, L., Buonamici, S., Lin, C. Y., Karlin, K. L., Zhang, X. H.-F., and Westbrook, T. F. (2021) Spliceosome-targeted therapies trigger an antiviral immune response in triple-negative breast cancer, *Cell*, **184**, 384-403.e21, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.031>.
65. Germanguz, I., Shtrichman, R., Osenberg, S., Ziskind, A., Novak, A., Domev, H., Laevsky, I., Jacob-Hirsch, J., Feiler, Y., Rechavi, G., and Itskovitz-Eldor, J. (2014) ADAR1 is involved in the regulation of reprogramming human fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **23**, 443-456, <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0206>.
66. Cuddleston, W. H., Li, J., Fan, X., Kozenkov, A., Lalli, M., Khalique, S., Dracheva, S., Mukamel, E. A., and Breen, M. S. (2022) Cellular and genetic drivers of RNA editing variation in the human brain, *Nat. Commun.*, **13**, 2997, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30531-0>.
67. Sledziowska, M., Winczura, K., Jones, M., Almaghrabi, R., Mischo, H., Hebenstreit, D., Garcia, P., and Grzechnik, P. (2023) Non-coding RNAs associated with Prader-Willi syndrome regulate transcription of neurodevelopmental genes in human induced pluripotent stem cells, *Hum. Mol. Genet.*, **32**, 608-620, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac228>.
68. Zhang, L.-M., Wang, M.-H., Yang, H.-C., Tian, T., Sun, G.-F., Ji, Y.-F., Hu, W.-T., Liu, X., Wang, J.-P., and Lu, H. (2019) Dopaminergic neuron injury in Parkinson's disease is mitigated by interfering lncRNA SNHG14 expression to regulate the miR-133b/ α -synuclein pathway, *Aging (Albany NY)*, **11**, 9264-9279, <https://doi.org/10.18632/aging.102330>.
69. Ansell, B. R. E., Thomas, S. N., Bonelli, R., Munro, J. E., Freytag, S., and Bahlo, M. (2021) A survey of RNA editing at single-cell resolution links interneurons to schizophrenia and autism, *RNA*, **27**, 1482-1496, <https://doi.org/10.1261/rna.078804.121>.
70. Vitali, P., Basyuk, E., Le Meur, E., Bertrand, E., Muscatelli, F., Cavaillé, J., and Huttenhofer, A. (2005) ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs, *J. Cell Biol.*, **169**, 745-753, <https://doi.org/10.1083/jcb.200411129>.
71. Galeano, F., Leroy, A., Rossetti, C., Gromova, I., Gautier, P., Keegan, L. P., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M. A., and Gallo, A. (2010) Human BLCAP transcript: new editing events in normal and cancerous tissues, *Int. J. Cancer*, **127**, 127-137, <https://doi.org/10.1002/ijc.25022>.
72. Puchalski, R. B., Louis, J. C., Brose, N., Traynelis, S. F., Egebjerg, J., Kukekov, V., Wenthold, R. J., Rogers, S. W., Lin, F., and Moran, T. (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors, *Neuron*, **13**, 131-147, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90464-2).
73. Akbarian, S., Smith, M. A., and Jones, E. G. (1995) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia, *Brain Res.*, **699**, 297-304, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00922-D](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00922-D).
74. Hideyama, T., Yamashita, T., Aizawa, H., Tsuji, S., Kakita, A., Takahashi, H., and Kwak, S. (2012) Profound down-regulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons, *Neurobiol. Dis.*, **45**, 1121-1128, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.033>.

RNA EDITING BY ADAR ADENOSINE DEAMINASES IN CELL MODELS OF CAG REPEAT EXPANSION DISEASES: A SIGNIFICANT EFFECT OF DIFFERENTIATION FROM STEM CELLS INTO BRAIN ORGANOIDS IN ABSENCE OF A SUBSTANTIAL INFLUENCE OF CAG REPEATS ON THE LEVEL OF EDITING

V. V. Kudriavskii^{1,2*}, A. O. Goncharov^{1,2}, A. V. Ereemeev², E. S. Ruchko²,
V. A. Veselovsky², K. M. Klimina², A. N. Bogomazova², M. A. Lagarkova²,
S. A. Moshkovskii^{2,3*}, and A. A. Kliuchnikova^{1,2,3}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University,
117997 Moscow, Russia; e-mail: wkudriavskii@gmail.com; moshrrffi@gmail.com

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

The expansion of CAG repeats in certain genes is a known cause of several neurodegenerative diseases, but the exact mechanism behind this is not yet fully understood. It is believed that double-stranded RNA regions formed by CAG repeats could be harmful to the cell. This study aimed to test the hypothesis that these RNA regions might potentially interfere with ADAR RNA editing enzymes, leading to reduced A→I editing of RNA and activation of the interferon response. We studied induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with Huntington's disease or ataxia type 17, as well as midbrain organoids developed from these cells. A targeted panel for next-generation sequencing was used to assess editing in specific RNA regions. The differentiation of iPSCs into brain organoids led to an increase in ADAR2 gene expression and a decrease in the expression of RNA editing inhibitor proteins. Consequently, there was an increase in the editing of specific ADAR2 substrates, allowing for the identification of differential substrates of ADAR isoforms. However, a comparison of pathology and control groups did not show differences in editing levels among iPSCs. Additionally, brain organoids with 42-46 CAG repeats did not exhibit global changes. On the other hand, brain organoids with the highest number of CAG repeats in the huntingtin gene (76) showed a significant decrease in the level of RNA editing of specific transcripts, potentially involving ADAR1. Notably, editing of the long non-coding RNA PWAR5 was nearly absent in this sample. In summary, the study found that in most cultures with repeat expansion, the hypothesized effect on RNA editing was not confirmed.

Keywords: RNA editing, Adenosine Deaminase Acting on RNA, trinucleotide repeat expansion diseases, Huntington's disease, ataxia type 17, induced pluripotent stem cells, midbrain organoids