

На правах рукописи

НЕКРАСОВ Евгений Дмитриевич

**Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных
плюрипотентных стволовых клеток человека**

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории генетики развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
КИСЕЛЕВ Сергей Львович,
заведующий лабораторией, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент,
СТРЕЛЬНИКОВ Владимир Викторович,
заведующий лабораторией, ФГБНУ
«Медико-генетический научный центр»,
г. Москва

кандидат биологических наук, профессор,
ДИТЯТЕВ Александр Эдуардович,
руководитель отдела, Немецкий центр
нейродегенеративных заболеваний, г. Бонн;
член Международного Совета,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита состоится «24» декабря 2015 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Болезнь Гентингтона – это неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется прогрессирующей гибелью нейронов полосатого тела головного мозга (стриатума). Распространенность болезни Гентингтона составляет 3-10 случаев на 100000 человек населения. Клинические проявления заболевания обычно развиваются в 35-44 года. В 1993 году был идентифицирован ген *хантингтин* (*HTT*), аномальная экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в котором является причиной болезни Гентингтона [1]. Болезнь развивается, когда число повторов превосходит 36. С ростом количества CAG-повторов проявления болезни становятся более яркими, а возраст дебюта заболевания значительно снижается, вплоть до раннего детского возраста [2]. Возможности использования нейронов пациентов в качестве *in vitro* модельной системы были сильно ограничены, поэтому основные результаты были получены на других организмах. Исследования болезни Гентингтона с использованием трансгенных моделей на животных выявили целый спектр нарушений, вызываемых мутантным *HTT*: формирование агрегатов мутантного хантингтина, повышенное содержание аутофагосом и активных форм кислорода в клетках, изменения экспрессии генов и др. Однако, эти нарушения в модельных организмах детектировались только при большом избыточном количестве CAG-повторов (более 60) и лишь частично воспроизводили заболевание. До сих пор остается неясным, каким образом мутация в гене *HTT* приводит к гибели нейронов, а методов лечения болезни Гентингтона пока не найдено. Разработанная в 2006 году технология генетического репрограммирования соматических клеток открыла возможность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, которые по своим свойствам аналогичны эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК): их можно неограниченно растить в культуре и дифференцировать в любые типы клеток [3]. Таким образом, появилась возможность искусственно получать пациент-специфичные нейроны человека в

любых требуемых количествах. Хотя нейроны, дифференцированные из ИПСК, были использованы для моделирования болезни Гентингтона, эти исследования имели ряд недостатков. В подавляющем большинстве работ были использованы клетки с большим количеством CAG-повторов (60 и более) в гене *HTT*, что соответствует ювенильной форме хореи Гентингтона, которая может принципиально отличаться от классической формы болезни Гентингтона по молекулярным механизмам. Более того, культуры нейронов, дифференцированные из ИПСК, содержали малый процент срединных шипиковых нейронов стриатума – типа клеток, наиболее подверженного дегенерации. По этим причинам разработка и исследование новых, более совершенных модельных систем на основе ИПСК человека является актуальной задачей.

Целью данной работы являлось изучение молекулярно-генетических механизмов болезни Гентингтона на основе нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* с целью поиска средств терапии.

Задачи работы:

1. Провести генетическое репрограммирование соматических клеток пациентов с болезнью Гентингтона с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* с целью создания модели заболевания *in vitro*.
2. Охарактеризовать линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от носителей болезни Гентингтона и контрольной группы.
3. Разработать воспроизводимый протокол эффективной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума, которые наиболее подвержены нейродегенерации *in vivo* при болезни Гентингтона.
4. Провести сравнительный анализ срединных шипиковых нейронов стриатума, полученных от носителей болезни Гентингтона и контрольной группы.

5. Изучить возможность использования разработанной модельной системы для поиска новых лекарственных средств, предотвращающих процесс нейродегенерации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нейроны, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, имеют морфологическое и молекулярно-генетическое сходство с срединными шипиковыми нейронами стриатума человека.

2. На основе дифференцированных из ИПСК пациент-специфичных нейронов с мутацией в гене *HTT* разработана воспроизводимая модельная система, отражающая основные нейродегенеративные процессы болезни Гентингтона, происходящие *in vivo* и *in vitro*.

3. На дифференцированных *in vitro* пациент-специфичных срединных шипиковых нейронах стриатума впервые показано действие потенциального лекарственного средства, предотвращающего нейродегенерацию при болезни Гентингтона с малым количеством избыточных CAG-повторов.

Научная новизна. Создана единственная в РФ коллекция гетерозиготных линий ИПСК человека с избыточным количеством CAG-повторов в гене *HTT*, разработан оригинальный протокол, который позволяет воспроизводимо и эффективно получать срединные шипиковые нейроны стриатума из плюрипотентных стволовых клеток человека. Впервые показано, что пациент-специфичные нейроны с мутацией в гене *HTT* демонстрируют повышенную частоту ядерных инвагинаций и повышенное содержание аутофагосом/лизосом. Впервые на нейронах, полученных методом генетического репрограммирования и дифференцировки клеток кожи пациентов – носителей мутантного аллеля в гене *HTT* продемонстрирован повышенный депоуправляемый вход кальция. Впервые продемонстрирована нейродегенерация патологических пациент-специфичных нейронов в модели старения, вызванного снижением активности протеасомного аппарата деградации белков. Впервые продемонстрирована способность соединения EVP4593

предотвращать гибель нейронов в разработанной модели старения, а также нормализовать депо управляемый вход кальция и содержание лизосом.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты данного исследования вносят вклад в понимание молекулярных механизмов классической формы болезни Гентингтона, являются значимым аргументом в пользу теории об основополагающей роли ионов кальция в патогенезе болезни Гентингтона и открывают перспективу создания нового лекарственного средства на основе EVP4593. Разработанная в данном исследовании модельная система может быть полезна для поиска новых лекарств от болезни Гентингтона.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: 53-й, 54-й и 55-й научной конференции МФТИ (Москва, 2010, 2011, 2012), конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Москва, 2011), 10 ежегодной международной конференции общества исследователей стволовых клеток (Июкогама, 2012), VI съезде ВОГиС (Ростов-на-Дону, 2014), конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014).

Личный вклад автора. Основные результаты были получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Получение и характеристика ИПСК выполнены совместно с Лагарьковой М.А., Богомазовой А.Н., Лебедевой О.С., Честковым И.В. Электрофизиологические исследования выполнены совместно с Вигонтом В.А. и Казначеевой Е.В. Электронно-микроскопические исследования выполнены совместно с Сульдиной Л.А. и Киселевой Е.В. Эксперименты по проточной цитометрии выполнены совместно с Васиной Е.М.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 93 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы.

Диссертация содержит 23 рисунка и 4 таблицы. Библиографический указатель содержит 182 источника.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 6 статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 7 тезисов докладов и материалов конференций и 1 глава монографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные методы исследования включали: получение первичных культур фибробластов, культивирование плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях, сборка и использование лентивирусов, проведение генетического репрограммирования, окраска антителами клеточных культур, ПЦР, GTG-дифференциальное окрашивание, спонтанная дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток, электронная микроскопия, электрофизиологические методы исследования, проточная цитометрия, количественный анализ формы клеточных ядер, количественный анализ гибели клеток, полногеномный анализ экспрессии генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическое репрограммирование и характеристика ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона. С использованием оптимизированного в данном исследовании протокола генетического репрограммирования, основанного на лентивирусной трансдукции фибробластов генами *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc* и *KLF4*, были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) от трех пациентов, наблюдавшихся в ФБГУ «Научный центр неврологии» с клиническим диагнозом «болезнь Гентингтона» (рис. 1А). Полнота генетического репрограммирования клонов ИПСК, отобранных для дальнейшего анализа, была определена по экспрессии эндогенных генов-маркеров плюрипотентных стволовых клеток, таких как *NANOG*, *FOXD3*, *HESX1*, *SALL4* (рис. 1Б) и способности специализироваться в клетки трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке *in vitro* и *in vivo*. При

спонтанной дифференцировке *in vitro* и окрашивании с использованием антител к белкам-маркерам трех зародышевых листков были выявлены клетки, положительные на маркер эктодермы пан-цитокератин (Cytokeratin), мезодермы CD105 и энтодермы α -фетопротеин (AFP) (рис. 1B). Также был выполнен тест на формирование тератом. Для этого недифференцированные ИПСК инъецировали подкожно в заднюю конечность иммунодефицитных мышей, после чего через 10-12 недель формировались опухоли. При гистологическом анализе опухолей в них были обнаружены ткани, принадлежащие к трем зародышевым листкам (рис. 1Г). Отобранные для дальнейшего анализа линии ИПСК имели нормальный кариотип 46 XX (рис. 1Д). Для проведения дальнейшего сравнительного анализа линий ИПСК, полученных от носителей болезни Гентингтона, был составлен и охарактеризован набор линий плюрипотентных стволовых клеток, включающий одну линию ИПСК от каждого пациента с болезнью Гентингтона (iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34), две ранее описанные линии ИПСК от здоровых людей endo-iPS 12 и iPSRG2L [4,5] и ранее описанной линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) hESM01 [6]. Количество CAG-повторов в аллелях гена *HTT* линий iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34 было определено методом секвенирования по Сэнгеру и составило 40/17, 47/16, 42/27 соответственно, отсутствие аномальной экспансии CAG-повторов в гене *HTT* в контрольных линиях было подтверждено методом ПЦР (рис. 1Е).

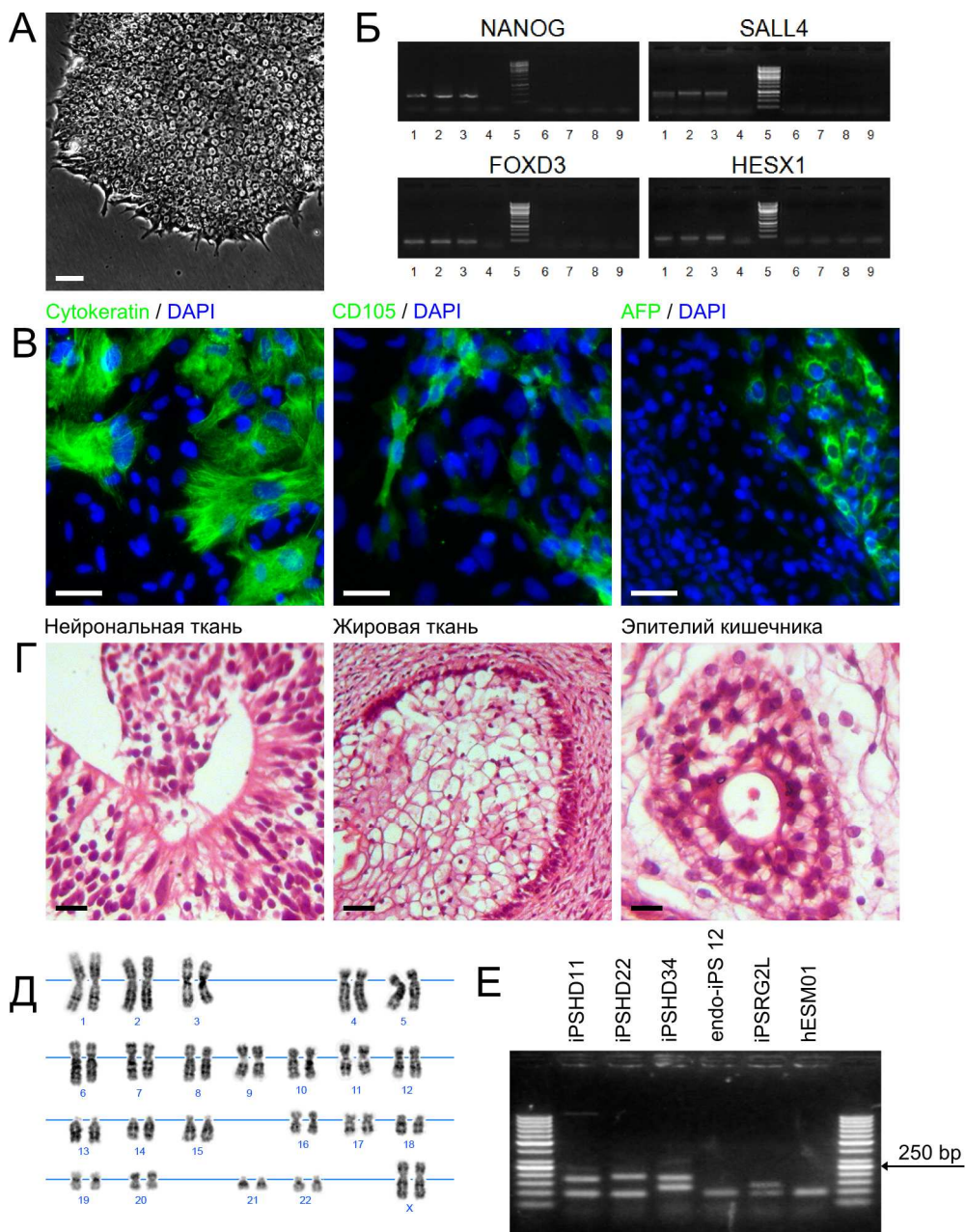


Рисунок 1. Получение и характеристика ИПСК. (А) – Микрофотография колонии ИПСК. Масштабная линейка 50 мкм. (Б) – Электрофореграммы продуктов ОТ-ПЦР на гены: *NANOG*, *FOXD3*, *HESX1*, *SALL4*. Все электрофореграммы имеют одинаковую структуру: 1 – ЭСК ОТ+, 2 – iPSHD21 ОТ+, 3 – iPSHD22 ОТ+, 4 – фибробласты ОТ+, 5 – маркер, 6 – ЭСК ОТ-, 7 – iPSHD21 ОТ-, 8 – iPSHD22 ОТ-, 9 – фибробласты ОТ-. ОТ – обратная транскриптаза. (В) – Окраска продуктов спонтанной дифференцировки клона ИПСК iPSHD22 антителами к маркерам трех зародышевых листков (зеленый цвет), ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка 50 мкм. (Г) – Окраска гематоксилином и эозином гистологических срезов тератомы, выращенной из клона ИПСК iPSHD22. Масштабная линейка 50 мкм. (Д) – Кариотип линии ИПСК iPSHD22 (GTG-дифференциальное окрашивание). (Е) – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации участка гена *HTT*, содержащего CAG-повтор с геномной ДНК использованных в работе патологических (iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34) и нормальных (iPSRG2L, endo-iPS 12, hESM01) линий плюрипотентных стволовых клеток. Более высокие полосы соответствуют большей экспансии CAG-повтора.

Разработка эффективного протокола дифференцировки ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума. Несмотря на то, что мутантный *HTT* экспрессируется практически во всех типах клеток организма, нейродегенерации подвержен, в первую очередь, вполне определенный тип нейронов – срединные шипиковые нейроны стриатума. Для того чтобы иметь возможность изучать тип клеток, наиболее подверженный патологии, был разработан эффективный протокол дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума. По разработанному протоколу сначала индуцировали дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток в нейрональном направлении с помощью рекомбинантного фактора *nodgin* и химических соединений *SB431542* и *dorsomorphin*, после чего индуцировали дифференцировку в клетки латерального ганглионарного бугорка с использованием химического соединения *pirtmorphamine* в концентрации 0.65 мкМ, что эквивалентно по своему действию 200 нг/мл рекомбинантного белка *Sonic Hedgehog*, который играет важную роль в развитии нервной системы. На последнем этапе нейрональные предшественники дифференцировали в зрелые нейроны с использованием рекомбинантного фактора *BDNF*. Анализ дифференцированных нейронов методом иммуноокрашивания показал, что около 80% нейронов экспрессировали специфический белок срединных шипиковых нейронов стриатума *DARPP-32* [7] (рис. 2А). Анализ культуры дифференцированных нейронов методом электронной микроскопии показал, что они имели морфологический признак срединных шипиковых нейронов стриатума – шипики, а также формировали синапсы (рис. 2Б). Методом ПЦР с обратной транскрипцией была показана экспрессия целого ряда описанных в литературе генов, характерных для этой группы нейронов, таких как *PPP1R1B*, *GAD1*, *DRD1*, *BCL11B*, *CALB1*, *SST*, *RASD2*, *PENK*, *ANO3*, *PDYN* (рис. 2В). Дифференцированные нейроны отвечали на калий-опосредованную деполяризацию мембраны, что говорит об их электровозбудимости, и секретировали в культуральную среду γ -аминомасляную кислоту до уровня

порядка 500 мкМ, что является функцией срединных шипиковых нейронов стриатума. Таким образом, показано, что дифференцированные по разработанному протоколу нейроны имели морфологические, генетические и функциональные признаки срединных шипиковых нейронов стриатума.

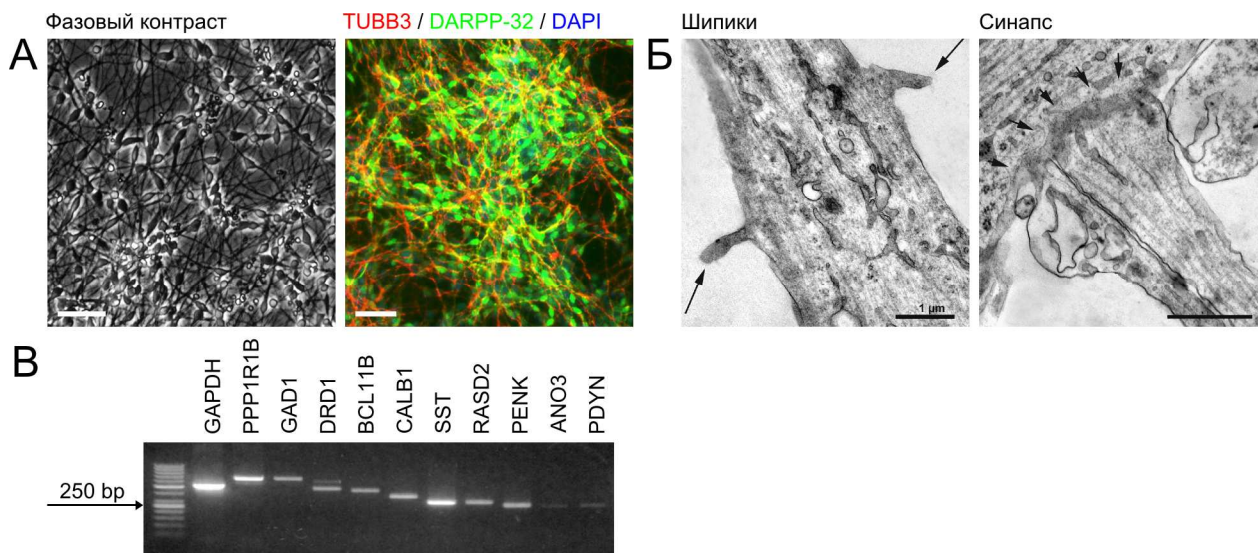


Рисунок 2. Характеристика нейронов, дифференцированных из ИПСК. (А) – Дифференцированные нейроны в фазовом контрасте и окрашенные антителами к DARPP-32 (зеленый) и TUBB3 (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка 50 мкм. (Б) – Микрофотографии шипиков и синапсов дифференцированных нейронов (просвечивающая электронная микроскопия). (В) – Репрезентативная электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР с кДНК дифференцированных нейронов, демонстрирующая экспрессию генов *PPP1R1B*, *GAD1*, *DRD1*, *BCL11B*, *CALB1*, *SST*, *RASD2*, *PENK*, *ANO3*, *PDYN*. Показан анализ линии клеток endo-iPS 12.

Сравнительный анализ срединных шипиковых нейронов стриатума, полученных от носителей болезни Гентингтона и контрольной группы.

Одной из задач данного диссертационного исследования являлось сравнительное исследование патологических и нормальных клеток для обнаружения признаков проявления заболевания в культурах нейронов с малым количеством избыточных CAG-повторов в мутантном аллеле гена *HTT*, чтобы на этой основе предложить функциональные тестовые системы, отражающие нейродегенерацию, клинически наблюдаемую при болезни Гентингтона. Известно, что наличие дополнительного полиглутаминового тракта в белке НТТ приводит к его неправильному фолдингу и агрегации. На клиническом материале ранее было продемонстрировано, что внутриклеточные включения

мутантного хантингина являются признаком болезни Гентингтона и могут быть детектированы с использованием антител EM48 против агрегированного белка [8]. Проведенный иммуоцитохимический анализ нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов, показал наличие EM48-положительных включений в зрелых патологических нейронах, которые культивировались на протяжении 6 месяцев (рис. 3А). В нейронах, полученных из контрольных линий ИПСК, таких включений обнаружено не было. Недавно было показано, что агрегированный мутантный хантингин разрушает ядерную оболочку клетки [9]. По этой причине была исследована морфология нормальных и патологических клеток, дифференцированных в срединные шипиковые нейроны стриатума, на субклеточном уровне с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Анализ результатов показал, что в патологических нейронах значительно чаще наблюдаются деформация ядерной оболочки, а также патологические нейроны содержат большее число лизосом и аутофагосом, чем нормальные нейроны (рис. 3А). На основании этого наблюдения была проведена количественная оценка содержания лизосом в нормальных и патологических нейронах методом проточной цитометрии живых нейронов, окрашенных флуоресцентным красителем лизосом LysoTracker Green DND-26. Было обнаружено, что патологические нейроны имеют более высокое медианное содержание лизосом по сравнению с контрольными нейронами (рис. 3Б). Повышенная частота деформаций ядерной оболочки была также обнаружена и методами флуоресцентной микроскопии при окрашивании ядер DAPI. Для количественной оценки инвагинаций ядерной оболочки был использован метод морфометрии клеточных ядер. Оказалось, что морфология ядра в патологических нейронах, полученных от трех пациентов, достоверно отличается от морфологии ядер в контрольных нейронах независимо от того, дифференцированы они из ИПСК или ЭСК (рис. 3В).

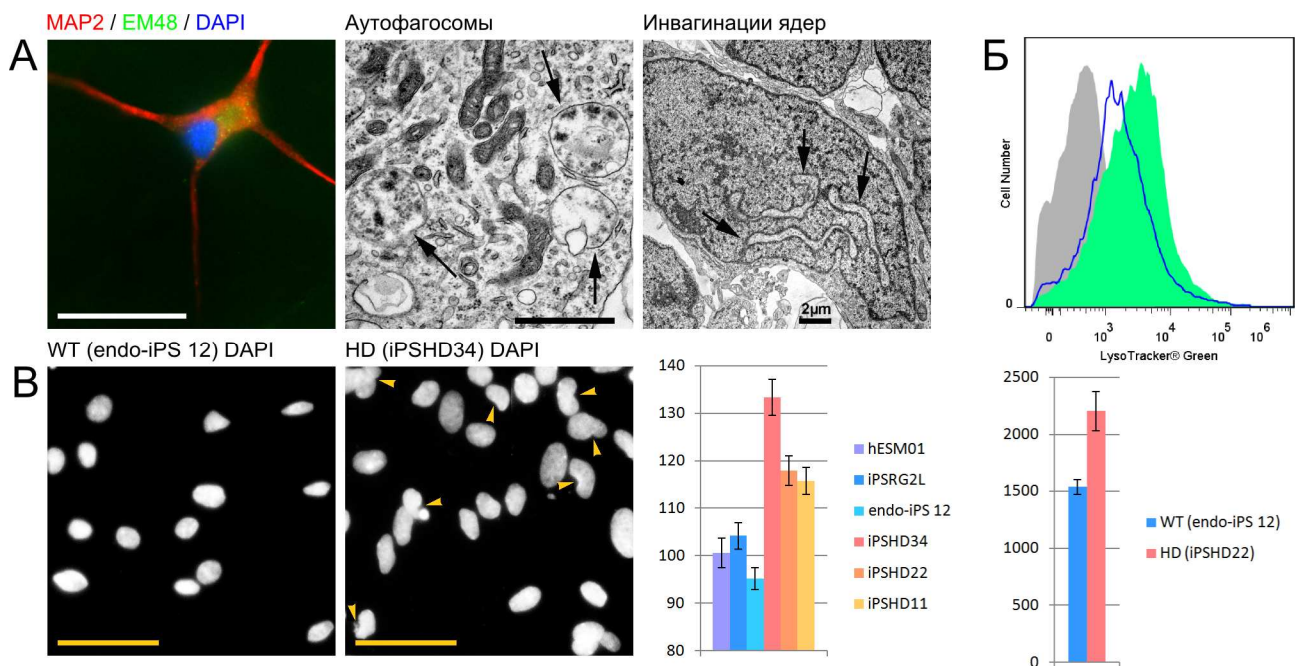


Рисунок 3. Различия между мутантными и нормальными нейронами. (А) – Окраска дифференцированного нейрона антителом к мутантному хантингтину (зеленый) и MAP2 (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка 50 мкм. Микрофотографии аутофагосом и ядерных инвагинаций (просвечивающая электронная микроскопия). (Б) – Анализ нормальных и патологических нейронов, окрашенных красителем лизосом LysoTracker Green DND-26 методом проточной цитометрии. На диаграмме: не окрашенные нейроны (серый), окрашенные нейроны дикого типа (синий), патологические окрашенные нейроны (зеленый). График демонстрирует медианную интенсивность флуоресценции по трем нормальным и трем патологическим образцам. (В) – Окрашенные DAPI патологические и нормальные нейроны, на фотографиях стрелками указаны инвагинации ядерной оболочки. Масштабная линейка 50 мкм. На графике представлено среднее значение коэффициента округлости клеточного ядра для нейронов, дифференцированных из патологических и нормальных линий плюрипотентных стволовых клеток (число подсчитанных ядер 786-1340 на точку).

Архитектура клеточного ядра важна для клеточных функций, непосредственно связанных с клеточной специализацией и сигналингом [10]. В связи с этим, изменения в структуре ядра должны найти свое отражение в экспрессии генов в патологических и контрольных нейронах. Сравнение экспрессии генов в мутантных и нормальных нейронах с помощью микрочипа Illumina Human HT-12 v4 выявило 183 гена, экспрессия которых повышена и 52 гена, экспрессия которых понижена в патологических нейронах ($\text{DiffScore} > 25$, $p < 0.05$). Среди выявленных генов были обнаружены гены, описанные ранее, как вносящие

вклад в патологию болезни Гентингтона. Например, нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, показали повышенную экспрессию гена *IFT57*, который вызывает HIP1 опосредованную гибель нейронов, действуя, вероятно, через активацию каспазы-8 комплексом HIP1-IFT57 [11], ген *ARHGEF6* повышает агрегацию мутантного хантингтина [12], а экспрессия гена *IRS2* необходима для клиренса мутантного хантингтина [13]. Более того, в культурах клеток, дифференцированных *in vitro*, была повышена экспрессия генов *TIMP1* и *IER3*, которые были недавно предложены в качестве биомаркеров болезни Гентингтона [14,15]. Классификация генов, экспрессия которых была повышена в мутантных нейронах, выявила их связь с сигнальными путями, вовлеченными в регуляцию внутриклеточного кальция (рис. 4).

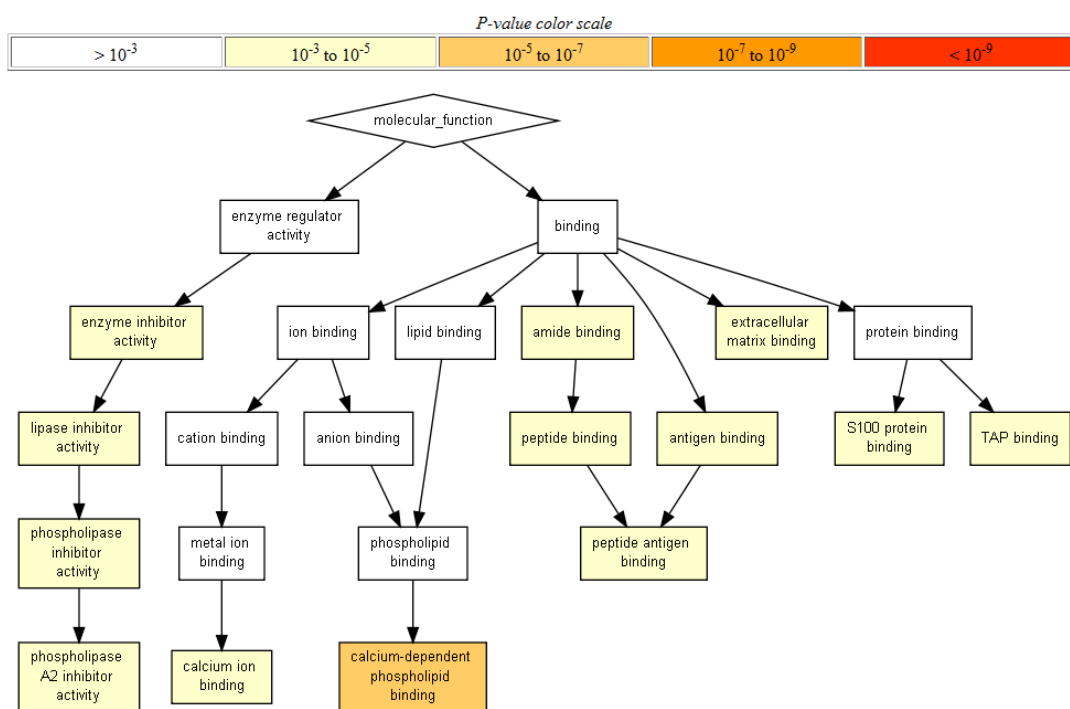


Рисунок 4. Классификация генов, которые экспрессируются на более высоком уровне в патологических нейронах, по молекулярной функции с использованием биоинформатического инструмента GOzilla.

Известно, что повышенное содержание ионов кальция в цитозоле является токсичным для нейронов и может быть одной из основных молекулярных причин гибели нейронов при болезни Гентингтона [16]. Одним из нарушений

кальциевой регуляции при болезни Гентингтона является повышенный депо-управляемый вход кальция в клетку, что было ранее обнаружено с использованием трансгенных моделей [17]. В связи с этим было проведено исследование депо-управляемого входа кальция в мутантных и нормальных нейронах из ИПСК человека методом patch-clamp в конфигурации whole cell. Полученные результаты продемонстрировали, что во всех трех линиях нейронов, дифференцированных из ИПСК, полученных от пациентов с болезнью Гентингтона, депо-управляемый вход кальция был повышен примерно в 2 раза по сравнению с нейронами, дифференцированными из линий ИПСК и ЭСК, имеющих нормальное количество CAG повторов в гене *HTT* (рис. 5А-Б).

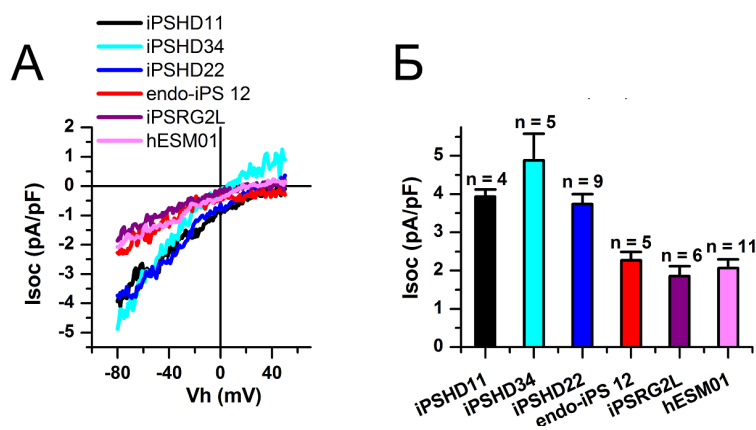


Рисунок 5. Депо-управляемый вход кальция в мутантных и нормальных нейронах. (А) – Усредненная вольт-амперная характеристика токов, вызываемых пассивным истощением кальция в депо с помощью 1 мкМ тапсигаргина в нейронах, дифференцированных из патологических и контрольных линий плюрипотентных стволовых клеток. (Б) – Средняя амплитуда депо-управляемых токов в каждой линии клеток.

Изучение потенциального лекарства от болезни Гентингтона EVP4593 с использованием разработанной модельной системы. Ранее было показано, что химическое соединение хинозолинового ряда EVP4593 нормализует депо-управляемый вход кальция и предотвращает гибель нейронов, полученных на основе трансгенных моделей [17]. Одним из основных преимуществ использования технологии генетического репрограммирования является возможность неинвазивного получения материала пациентов и исследование

эффективности или безопасности потенциального лекарственного средства *in vitro* на нормальных функциональных клетках индивидуума. Это открывает большие возможности высоконадежной валидации терапевтического потенциала лекарственных средств еще до проведения доклинических и клинических испытаний. Было решено использовать разработанную модельную систему болезни Гентингтона для изучения терапевтического потенциала EVP4593. Было обнаружено, что обработка клеток EVP4593 снижает содержание лизосом/аутофагосом и депо-управляемый вход кальция в патологических нейронах (рис. 6А-Б). Однако, не удалось обнаружить влияние исследуемого вещества на инвагинацию ядерной оболочки патологических нейронов, что может быть связано с тем, что EVP4593 воздействует на другой сигнальный путь. Основной причиной клинического проявления болезни Гентингтона является гибель срединных шипиковых нейронов стриатума, поэтому наиболее важным критерием является возможность предотвращения гибели нейронов. Клинически болезнь Гентингтона проявляется в зрелом возрасте (35-44 года), и, вероятно, молекулярные изменения, происходящие при старении, вовлечены в процесс гибели мутантных срединных шипиковых нейронов стриатума. Так, при культивировании дифференцированных *in vitro* нейронов на протяжении двух-шести месяцев, не было обнаружено никаких достоверных признаков гибели нейронов, несущих мутацию в гене *HTT*. Не исключено, что за этот период не происходило существенных изменений на молекулярном уровне, которые при более продолжительной ситуации *in vivo* приводят к нейродегенерации. Известно, что с возрастом падает активность протеасомной деградации белков. Изменения белкового гомеостаза клетки, вызванные снижением эффективности работы протеасомной системы, гипотетически лежат в основе возрастных болезней человека [18]. При этом пост-митотические клетки подвержены наиболее сильному ингибированию функций протеасом, чем делящиеся клетки. Чтобы смоделировать старение нейронов *in vitro*, было использовано ингибирование протеасомной системы пептидным протеасомным ингибитором MG132. Культуры нормальных и

мутантных нейронов обрабатывали 10 мкМ MG132 в течение 24 часов, после чего измеряли уровень клеточной гибели (LoCD). Было обнаружено, что культуры патологических нейронов содержали в 2 раза больше мертвых клеток, чем культуры нормальных нейронов (рис. 6В). Таким образом, было впервые показано, что срединные шипиковые нейроны стриатума, полученные методом направленной дифференцировки из генетически репрограммированных фибробластов кожи носителей болезни Гентингтона, имеют повышенную чувствительность к снижению активности протеасомной системы деградации белков и подвержены преждевременной гибели. В связи с тем, что соединение EVP4593 нормализовало лизосомный состав патологических нейронов и депо-управляемый вход кальция, нами было изучено действие этого химического соединения на выживаемость нейронов в модели протеасомного старения. Применение EVP4593 продемонстрировало значительное снижение индуцированной MG132 гибели патологических нейронов (рис. 6Г).

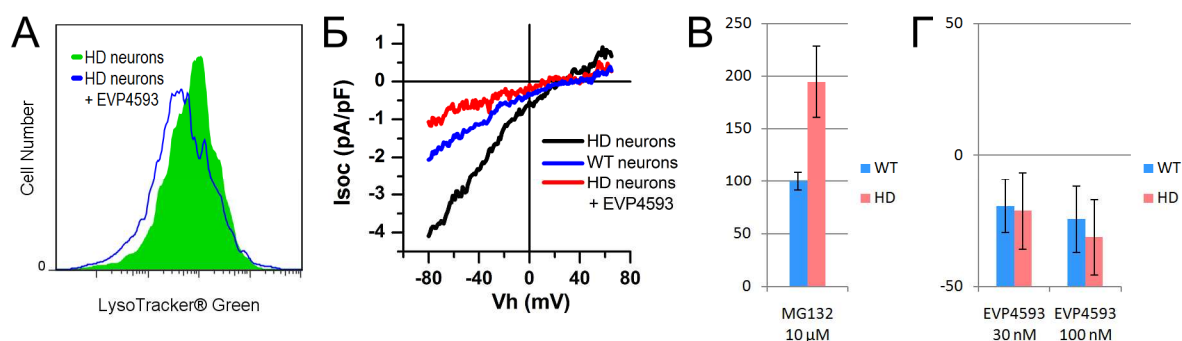


Рисунок 6. Действие EVP4593 на мутантные нейроны. (А) – Анализ методом проточной цитометрии окрашенных LysoTracker Green DND-26 патологических нейронов, обработанных 24 часа 100 нМ EVP4593 и без обработки. (Б) – Усредненная вольт-амперная характеристика токов, вызываемых пассивным истощением кальция в депо с помощью 1 мкМ тапсигаргина в патологических нейронах после того, как ток достиг максимального (черная линия) и после применения EVP4593 3 мкМ (красная линия), а также в контрольных нейронах после того, как ток достиг максимального значения (синяя линия). (В) – LoCD нормальных и патологических нейронов после обработки 24 часа 10 мкМ MG132. Значение WT представляет средний LoCD endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 нейронов, в то время как значение HD представляет средний LoCD iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 нейронов (n = 30). (Г) – Влияние EVP4593 на LoCD, индуцированный 10 мкМ MG132. Значение WT представляет среднюю дельту LoCD endo-iPS 12, iPSRG2L и hESM01 нейронов, в то время как значение HD представляет среднюю дельту LoCD iPSHD11, iPSHD22 и iPSHD34 нейронов (n = 30).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования создана новая модель болезни Гентингтона на основе срединных шипиковых нейронов, дифференцированных из ИПСК человека. Модель воспроизводит целый ряд проявлений болезни Гентингтона и может быть полезна для поиска и разработки новых лекарств, а также изучения молекулярных механизмов болезни Гентингтона. Результаты исследования вещества EVP4593 с использованием разработанной модели позволяют надеяться на создание на его основе нового лекарственного средства.

ВЫВОДЫ

1. С использованием технологии генетического репрограммирования создана коллекция линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с болезнью Гентингтона с избыточным количеством CAG-повторов (40-47) в гене *HTT* и проведена их характеристика.
2. Разработан воспроизводимый и высокоэффективный протокол дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума.
3. Впервые показано, что дифференцированные *in vitro* нейроны, несущие избыточное количество CAG-повторов (40-47) в гене *HTT*, имеют повышенную лизосомальную активность, демонстрируют повышенную частоту инвагинаций ядерной оболочки по сравнению с контрольными нейронами, а также повышенный депо-управляемый вход кальция.
4. На модели нейродегенерации стареющих *in vitro* пациент-специфичных срединных шипиковых нейронов стриатума, дифференцированных из генетически репрограммированных соматических клеток носителей болезни Гентингтона, впервые продемонстрировано терапевтическое действие малой химической молекулы EVP4593.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. **Некрасов, Е.Д.** Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как модель для изучения болезней человека / **Е.Д. Некрасов**, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – № 2. – С. 32-37.
2. **Некрасов, Е.Д.** Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями / **Е.Д. Некрасов**, О.С. Лебедева, И.В. Честков, М.А. Сюсина, Е.Ю. Федотова, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев, И.А. Гривенников, С.Н. Иллариошкин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – № 4. – С. 82-88.
3. **Некрасов, Е.Д.** Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток / **Е.Д. Некрасов**, О.С. Лебедева, Е.М. Васина, А.Н. Богомазова, И.В. Честков, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова, С.А. Ключников, С.Н. Иллариошкин, И.А. Гривенников // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2012. – Т. 6. – № 4. – С. 30-35.
4. Панова, А.В. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории / А.В. Панова, **Е.Д. Некрасов**, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев, А.Н. Богомазова // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, – № 2. – С. 54-61.
5. Bogomazova, A.N. Reactivation of X chromosome upon reprogramming leads to changes in the replication pattern and 5hmC accumulation / A.N. Bogomazova, М.А. Lagarkova, А.В. Panova, **E.D. Nekrasov**, S.L. Kiselev // Chromosoma. – 2014. – V. 123, – № 1-2. – P. 117-28.
6. Богомазова, А.Н. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования / А.Н. Богомазова, Е.М. Васина, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова, О.С. Лебедева, **Е.Д. Некрасов**, А.В. Панова, Е.С. Филоненко, Е.А. Хомякова,

Л.В. Цховребова, И.В. Честков, М.В. Шутова // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 4. – С. 466.

Коллективная монография:

Некрасов, Е.Д. Репрограммирование соматических клеток: возможности применения для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения / **Е.Д. Некрасов**, И.В. Честков, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. Угрюмова М.В. – Москва: Научный мир, – 2014.

Тезисы докладов и материалы конференций (избранное):

1. **Некрасов, Е.Д.** Получение индуцированных стволовых клеток из фибробластов кожи больных наследственной формой болезни Паркинсона / **Е.Д. Некрасов**, И.В. Честков, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова // Труды 53-й научной конференции МФТИ «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». Часть IV. Молекулярная и биологическая физика. – Москва: МФТИ, – 2010. – С. 204-205.

2. **Некрасов, Е.Д.** Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи пациента, страдающего болезнью Гентингтона, для построения *in vitro* модели болезни Гентингтона / **Е.Д. Некрасов**, М.А. Сюсина, И.В. Честков, О.С. Лебедева, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова // Труды 54-й научной конференции МФТИ «Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе». Молекулярная и биологическая физика. – Москва: МФТИ, – 2011. – С. 114-115.

3. **Некрасов, Е.Д.** Получение индуцированных стволовых клеток из фибробластов кожи больных наследственными формами нейродегенеративных заболеваний / **Е.Д. Некрасов** // Сборник трудов Всероссийской молодёжной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук», проводимой в рамках Второй международной научной школы для молодёжи «Прикладные математика и физика: от фундаментальных исследований к инновациям»: сб. науч. тр. – Москва: МФТИ, – 2011. – С. 87-88.

4. **Nekrasov, E.D.** Induced pluripotent stem cells based model system for studying Huntington's disease / **E.D. Nekrasov**, O.S. Lebedeva, I.V. Chestkov, M.A. Susina, I.A. Grivennikov, S.N. Illarioshkin, S.L. Kiselev, M.A. Lagarkova // International Society for Stem Cell Research (ISSCR). ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13-16, – 2012.
5. **Некрасов, Е.Д.** Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в обогащенные популяции ГАМК-эргических нейронов стриатума / **Е.Д. Некрасов**, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев // Труды 55-й научной конференции МФТИ: Всероссийской научной конференции «Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе», Научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук в области физики и астрономии», Всероссийской молодежной научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». Молекулярная и биологическая физика. – Москва: МФТИ, – 2012. – С. 106-107.
6. **Некрасов, Е.Д.** Сравнительный анализ нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с болезнью Гентингтона и здоровых пациентов / **Е.Д. Некрасов**, Е.С. Кострюкова, В.М. Говорун, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев // Труды конференции: «VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы». – Ростов-на-Дону: ФГУП «Издательство СО РАН», – 2014. – С. 114.
7. **Некрасов, Е.Д.** Изучение молекулярных механизмов хореи Гентингтона с использованием репрограммированных клеток человека / **Е.Д. Некрасов** // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань: КФУ, – 2014. – С. 125.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. // *Cell*. 1993. Vol. 72, № 6. P. 971–983.
2. Sunwoo J.-S., Lee S.-T., Kim M. A case of juvenile huntington disease in a 6-year-old boy. // *J. Mov. Disord.* 2010. Vol. 3, № 2. P. 45–47.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. // *Cell*. 2006. Vol. 126, № 4. P. 663–676.
4. Lagarkova M.A. et al. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. // *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9, № 5. P. 937–946.
5. Amps K. et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. // *Nat. Biotechnol.* 2011. Vol. 29, № 12. P. 1132–1144.
6. Lagarkova M.A. et al. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. // *Cell Cycle*. 2006. Vol. 5, № 4. P. 416–420.
7. Ouimet C.C., Langley-Gullion K.C., Greengard P. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. // *Brain Res.* 1998. Vol. 808, № 1. P. 8–12.
8. Li X.J. et al. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. // *Nature*. 1995. Vol. 378, № 6555. P. 398–402.
9. Liu K.-Y. et al. Disruption of the nuclear membrane by perinuclear inclusions of mutant huntingtin causes cell-cycle re-entry and striatal cell death in mouse and cell models of Huntington's disease // *Hum. Mol. Genet.* 2014. Vol. 24, № 6. P. 1602–1616.
10. Gdula M.R. et al. Remodeling of three-dimensional organization of the nucleus during terminal keratinocyte differentiation in the epidermis. // *J. Invest. Dermatol.* 2013. Vol. 133, № 9. P. 2191–2201.
11. Gervais F.G. et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 2. P. 95–105.
12. Eriguchi M. et al. alpha Pix enhances mutant huntingtin aggregation // *J. Neurol. Sci.* 2010. Vol. 290, № 1-2. P. 80–85.
13. Yamamoto A., Cremona M.L., Rothman J.E. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 172, № 5. P. 719–731.
14. Lorenzl S. et al. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases // *J. Neurol. Sci.* 2003. Vol. 207, № 1-2. P. 71–76.
15. Runne H. et al. Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 36. P. 14424–14429.
16. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends Mol. Med.* 2009. Vol. 15, № 3. P. 89–100.
17. Wu J. et al. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. // *Chem. Biol.* 2011. Vol. 18, № 6. P. 777–793.
18. Morimoto R.I., Cuervo A.M. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. Vol. 69 Suppl 1. P. S33–S38.