

Лебедева Ольга Сергеевна

**Создание модельной системы для изучения функции генов,
ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием
технологии генетического репрограммирования.**

Специальность 03.02.07– Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной генетики Российской академии наук и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

ГРИВЕННИКОВ Игорь Анатольевич – заведующий лабораторией молекулярной генетики соматических клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, г. Москва

доктор биологических наук, профессор РАН

ЛАГАРЬКОВА Мария Андреевна - заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва; заведующий лабораторией генетики развития в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

ВОРОТЕЛЯК Екатерина Андреевна – исполняющий обязанности заведующего лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, г. Москва

доктор биологических наук, доцент

СТРЕЛЬНИКОВ Владимир Викторович – заведующий лабораторией эпигенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр», г. Москва

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук (119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ИОГен РАН» и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-(499)-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Наследственные нейродегенеративные заболевания представляют собой одну из наиболее актуальных проблем современной неврологии и нейробиологии (Иллариошкин С.Н. с сотр., 2003, Thomas V., et al., 2007). В связи со старением населения, особое значение приобретают нейродегенеративные заболевания, связанные с возрастом, такие как болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона и ряд других патологий. БП - прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. БП развивается в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции, что может быть вызвано как факторами внешней среды, так и наследственными факторами (Drouin-Ouellet J. et al., 2012). Медикаментозные методы лечения могут лишь замедлить развитие заболевания, но не излечить его. Возможно, это связано с тем, что молекулярные механизмы патологии, даже для распространенных генетических мутаций, остаются слабо изученными. До последнего времени исследования патологии БП проводились на постмортальных образцах мозга или на модельных системах. Постмортальные образцы демонстрируют конечные стадии патологического процесса, связанные с нарушением морфологии отделов мозга и утратой физиологических связей между структурами, но не обеспечивают достаточной информации о начальных стадиях болезни, которые имеют место еще до манифестации заболевания. Экспериментальные модели на животных также имеют ограниченную применимость. В этом случае поражение специфического типа нервных клеток индуцируется введением химических веществ или повышенной экспрессией мутантного гена, с которым связывают развитие болезни. Модель, основанная на таком нефизиологическом пути индукции БП у лабораторного животного, не всегда может адекватно воспроизводить симптомы заболевания. Осуществлять скрининг и проверку новых лекарственных препаратов на животных возможно, но этот способ имеет ограничения, так как некоторые вещества метаболизируются организмом животного по путям, отличным от человеческого организма. Использование трансгенных линий трансформированных клеток (культур нейробластомы человека), также имеет существенные ограничения, т.к. многие сигнальные пути опухолевых клеток оказываются нарушенными. Для более детального изучения закономерностей развития БП требуется разработка адекватных моделей, воспроизводящих генетические и молекулярные особенности патологического процесса. Решением данной проблемы может быть создание модели заболевания на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных с использованием технологии генетического репрограммирования (Takahashi K and Yamanaka S., 2006) из материала пациентов с установленным диагнозом БП. Неограниченное время жизни ИПСК в культуре, вместе с возможностью направленной дифференцировки в любой желаемый тип клеток, позволяют разрабатывать клеточные модели наследственных заболеваний (Богомазова А.Н. с сотр., 2015). Сочетание методов репрограммирования и направленной дифференцировки предоставляет уникальную возможность для изучения механизмов патологии и тестирования новых терапевтических средств.

Таким образом, создание модели БП с использованием метода генетического репрограммирования в ИПСК и разработка протокола направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны, позволит изучить молекулярно-генетические особенности функционирования мутантных генов в клетке и определить механизмы развития заболевания на клеточном уровне. Дифференцированные производные ИПСК могут быть использованы для скрининга новых лекарственных препаратов.

Целью исследования являлось обоснование возможности использования культур клеток, полученных из ИПСК пациентов, страдающих БП, и дифференцированных в нейрональном направлении, для изучения функций генов, ассоциированных с патогенезом этого заболевания.

В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить ИПСК от пациентов с БП и от здоровых доноров с помощью интегрирующихся и неинтегрирующихся вирусных векторов, несущих гены репрограммирования Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, и охарактеризовать полученные клетки молекулярно-генетическими методами и с помощью функционального теста.

2. Изучить влияние интеграционного и неинтеграционного способа доставки генов репрограммирования на метилирование ДНК в репрограммированных пациент-специфических клетках на полногеномном уровне.
3. Разработать эффективный и воспроизводимый протокол дифференцировки ИПСК человека в тирозингидроксилаза (ТН) - положительные постмитотические нейроны.
4. Изучить влияние мутаций в генах *PARK2* и *PARK8* на поведение клеточных культур на разных стадиях дифференцировки и на транскриптом постмитотических нейронов *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту

- Линии ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*, не отличаются от ИПСК без мутаций по морфологии, пролиферативной активности, уровню экспрессии основных генов плюрипотентного состояния и способности дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.
- Метод получения ИПСК (интеграционный и неинтеграционный) не оказывает влияния на полногеномный паттерн метилирования ДНК в клетках, полученных от одного донора.
- Разработанный протокол направленной дифференцировки ИПСК в нейрональном направлении позволяет получать культуры постмитотических нейронов на 70-90% состоящие из ТН – положительных клеток, способных к секреции дофамина.
- Наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными генами при БП являются группы генов, ответственные за метаболические пути, связанные с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом.

Научная новизна и значимость работы

В ходе работы впервые в России были получены линии пациент-специфичных ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*. Проведено изучение влияния интеграционного и неинтеграционного метода репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК на полногеномном уровне. Проведенный анализ впервые продемонстрировал отсутствие достоверных различий между способами доставки репрограммирующих факторов в фибробласты кожи человека.

Разработан эффективный и воспроизводимый протокол нейрональной дифференцировки ИПСК, который позволяет получать культуру постмитотических нейронов, более чем на 80% состоящую из (ТН) - положительных клеток.

При анализе транскриптома ТН-положительных нейронов, дифференцированных из ИПСК, были показаны специфические для генов *PARK2* и *PARK8* различия в таких клеточных процессах, как развитие нейронов, синтез нейромедиаторов, функционирование фагосом и лизосом, деление клетки и клеточный цикл, функционирование митохондрий, гликолиз. Таким образом, впервые разработаны системы для изучения функции генов *PARK2* и *PARK8*, позволяющие моделировать развитие патогенеза БП *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования показали, что полученные из ИПСК пациент-специфичные нейроны на транскриптомном уровне проявляют мутантный фенотип *in vitro*. Таким образом, создана система, позволяющая изучать как индивидуальные особенности патологии, так и общие для разных генотипов черты. Высокий процент ТН - положительных клеток и наличие в клетках мутаций, связанных с развитием БП, делают полученные культуры нейронов удобной модельной системой для изучения молекулярных и клеточных механизмов развития заболевания, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Разработанная методика дифференцировки и ее модификации являются предметом патентной заявки. Простота и воспроизводимость протоколов цитофлуориметрического анализа позволяет широко использовать их в клинической практике персоналом любой квалификации. Технология получения ИПСК неинтеграционным методом в будущем может быть использована в целях клеточной терапии различных заболеваний человека.

Апробация результатов работы

Результаты проведенных исследований были представлены на международных и российских конференциях, в том числе: на 10 ежегодной встрече Международного Общества Исследователей Стволовых Клеток (ISSCR 10th Annual meeting, Yokohama, Japan) в 2012 г.; на VIII Международной конференции “Молекулярная генетика соматических клеток”, Звенигород, Россия, 2011г.; на III конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты», Москва 2011 г; на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды», Петрозаводск, 2011 г; на симпозиуме Международного Общества Исследователей Стволовых Клеток “Stem Cell Models of Neural Regeneration and Disease”, Дрезден, Германия, 2016 г.

Личный вклад автора

Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Получение и характеристика ИПСК выполнены совместно с Лагарьковой М.А., Богомазовой А.Н., Некрасовым Е.Д., Майоровой К.С., Честковым И.В., Сурдиной А.В., Сюсиной М., Новосадовой Е.В. Эксперименты по проточной цитофлуориметрии выполнены совместно с Васиной Е.М. Эксперименты по полногеномным анализам выполнены совместно с Шутовой М.В. и Васиной Е.М. Количественное определение дофамина выполнено совместно с Позмоговой Г.Е.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 158 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений, список цитируемой литературы и приложения. Диссертация содержит 24 рисунка и 15 таблиц. Библиографический указатель содержит 218 источников.

Публикации

Автором опубликовано 12 печатных научных работ, в том числе 7 статей по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Биоптаты кожи были получены из Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» РАН. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ИОГен РАН. В ходе настоящей работы были получены ИПСК из фибробластов кожи здоровых доноров и пациентов с наследственными формами БП с применением двух методов вирусной доставки генов транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус. Lentивирусные векторы были сконструированы в Институте общей генетики РАН на основе коммерчески доступного вектора LeGO-G2 (<http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm>) (Некрасов Е.Д. с сотр., 2011; Лебедева О.С. с сотр., 2013). Для неинтеграционного метода доставки использовался вирус Сендай любезно предоставленный Я. Костинахо (Университет Восточной Финляндии, Куопио) Методами ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического окрашивания в полученных линиях ИПСК была показана экспрессия генов и наличие белков, характерных для плюрипотентного состояния. Методом спонтанной дифференцировки через стадию эмбрионных телес с последующим иммуноцитохимическим окрашиванием дифференцированных клеток на маркеры трех зародышевых листков была подтверждена плюрипотентность полученных ИПСК на функциональном уровне.

Паттерн метилирования ДНК в клонах ИПСК, полученных от одного донора интеграционным и неинтеграционным методами сравнивали методом полногеномного метиломного анализа. Выделенную геномную ДНК подвергали бисульфитной конверсии и гибридизовали с Infinium 450K Bead Chips (Illumina, Inc.), затем сканировали прибором iScan (Illumina, Inc.). Качество данных проверяли в программе GenomeStudio. Beta-value и p-value для каждого образца загружали в программу IMAR (<http://cran.r-project.org/>), данные обрабатывали в этой программе. Для поиска

различий в индивидуальных сайтах CpG использовали следующие критерии: разница средних значений между группами образцов $>0,2$; уровень значимости детекции $p\text{-value} < 0.01$; параметр наличия ложных результатов по тесту Бенджамини-Хочберг $q\text{-value} < 0.05$.

Был разработан высокоэффективный протокол направленной нейрональной дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны. В полученных нейрональных культурах методами ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического окрашивания была показана экспрессия маркеров специфического типа нейронов и зрелости нейронов. Эффективность дифференцировки определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с окраской на общенейрональные маркеры (CD56 и CD24) и TH. Постмитотический статус нейронов определяли методом анализа клеточного цикла на проточном цитофлуориметре. Данные полногеномного транскриптомного анализа анализировали с помощью программ Genome Studio и WebGestalt.

Результаты исследования

Получение, характеристика и сравнительный анализ эффективности репрограммирования фибробластов кожи человека интеграционным и неинтеграционным методами

В исследование были включены три пациента мужского пола с наследственной болезнью Паркинсона. Два пациента имели мутации в гене *PARK8*, кодирующем киназу *LRRK2* (замена 6055G>A (G2019S) в 41 экзоне (хромосома 12q12)), возраст обоих пациентов на момент взятия биопсии составлял 60 лет; (линии фибробластов кожи, полученные из материала от этих пациентов, обозначили FPD1 и FPD2). В исследование был также включен пациент с мутациями в двух аллелях гена *PARK2*, кодирующего E3-убиквитин-лигазу паркин (делеция 202-203 AG во втором экзоне и сплайсинговая мутация в 1 интроне (IVS1+1G/A)), возраст пациента на момент взятия биопсии 65 лет (линии фибробластов кожи, полученные из материала от этого пациента, обозначили FPD3). Также были получены биоптаты от трех здоровых доноров: один донор мужского пола, возраст на момент взятия биопсии 60 лет (линии фибробластов кожи, полученные из материала от этого донора, обозначили FRG), двух доноров женского пола, возраст на момент взятия биопсии 18 и 26 лет (линии фибробластов кожи, полученные от этих доноров, обозначили FHD1 и FD, соответственно).

Для получения ИПСК из фибробластов кожи с помощью лентивирусной трансдукции использовали лентивирусные векторы, несущие гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*. Начиная с 7 дня после инфекции, в течение недели клетки обрабатывали «малыми молекулами» VPA и VIX-01294. Используемые вещества являются ингибиторами деацетилаз гистонов и метилазы гистонов, соответственно. Для всех изученных линий клеток ЭСК – подобные колонии начинали появляться через 14 дней после инфекции лентивирусами. Эффективность репрограммирования составила 0,2%. При получении ИПСК неинтеграционным методом с помощью инфекции вирусом Сендай эффективность получения ИПСК также составила 0,2%, но колонии, морфологически сходные с ЭСК, начинали появляться уже на 10 день после инфекции.

ИПСК, полученные из фибробластов кожи методом инфекции вирусом Сендай, на первых пассажах имели склонность к спонтанной дифференцировке в нейрональном направлении (в культуре присутствовали клетки характерной морфологии с 1-2 длинными отростками), чего не наблюдалось у линий ИПСК, полученных лентивирусным методом. Однако через 4-6 пассажей на среде mTeSR1 эти линии ИПСК стабилизировались. Других различий в морфологии и свойствах клеток выявлено не было. Полученные клоны ИПСК морфологически сходны с ЭСК человека: клетки имеют размер порядка 20 мкм, большое соотношение ядро-цитоплазма, растут монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками (Рисунок 1).

Методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что в ИПСК, полученных интеграционным методом, отсутствует экспрессия трансгенных *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, а наблюдаемая экспрессия этих транскрипционных факторов происходит с генома репрограммированных клеток.

В процессе репрограммирования до плюрипотентного состояния гены, определяющие дифференцированное состояние клетки, замолкают, и активируются гены поддержания плюрипотентного состояния. Анализ экспрессии маркерных генов (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *DPPA4*,

HesX1), отвечающих за поддержание плюрипотентного состояния, в клонах ИПСК проводили методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. ИПСК, полученные интеграционным методом, как и ИПСК, полученные неинтеграционным методом, экспрессировали мРНК генов поддержания плюрипотентного состояния на уровне, сопоставимом с ЭСК человека, а экспрессия мРНК этих генов в исходных линиях фибробластов отсутствовала (Рисунок 2).

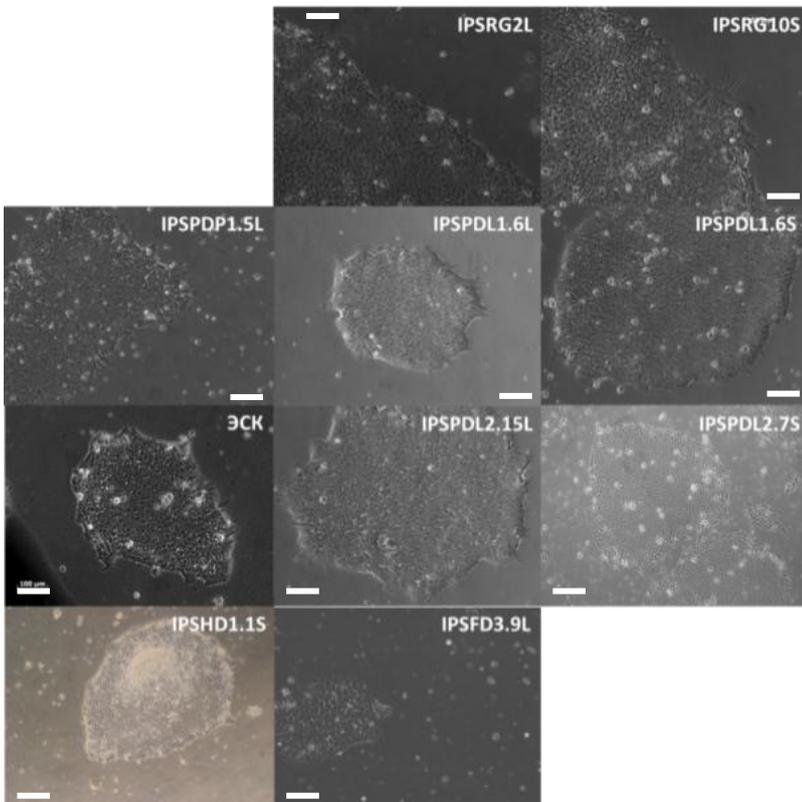


Рисунок 1. Морфология ЭСК линии hESM01 и ИПСК человека, полученных разными методами. Увеличение 100X, масштабная линейка 100мкм. IPSRG2L, IPSFD3.9L – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG10S и IPSHD1.1S - линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.7S - линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

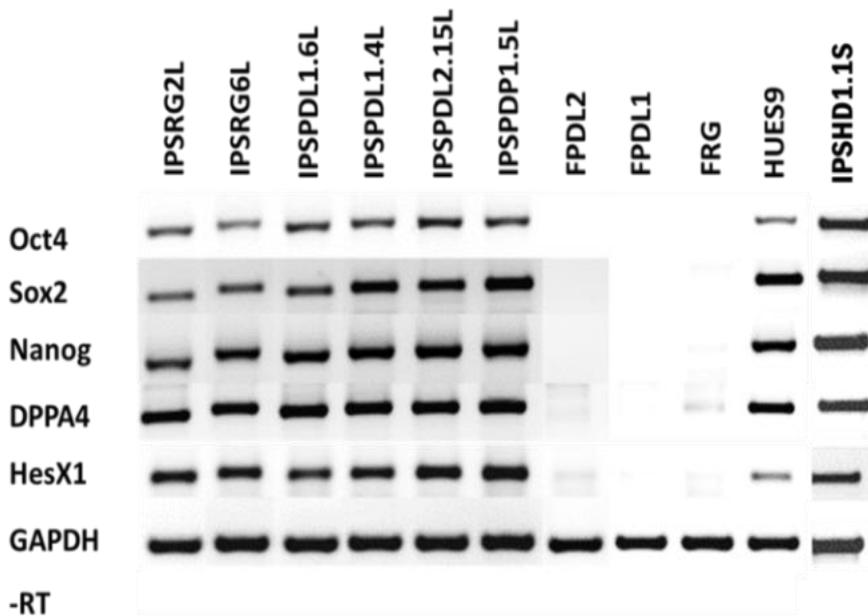


Рисунок 2. Сравнение экспрессии генов, характерных для плюрипотентного состояния, в полученных линиях ИПСК, исходных линиях фибробластов кожи человека и ЭСК методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. IPSRG2L, IPSRG6L и IPSHD1.1S – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров; IPSPDL1.6L, IPSPDL1.4L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*. Линия ИПСК IPSHD1.1S получена неинтеграционным

методом, остальные линии ИПСК получены интеграционным методом. FRG – линия фибробластов, полученная от здорового донора мужского пола, FPD1 и FPD2 – линии фибробластов, полученные от двух пациентов с мутацией в гене *PARK8*.

Все полученные линии ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния и на уровне белка. Все отобранные для анализа клоны ИПСК специфично окрашивались антителами на *Oct4*, *Nanog*, TRA-1-81 и SSEA-4 (Рисунок 3).

Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса клонов ИПСК, полученных из фибробластов кожи человека, был использован тест на формирование клетками эмбрионных тел, а также анализ их последующей дифференцировки в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам. В таких культурах спонтанно дифференцировавшихся ИПСК присутствовали клетки, положительно окрашивающиеся на маркеры эктодермы (панцитокератин, β -III-тубулин, NeuN, Sox1), мезодермы (CD105, тропомиозин, десмин) и энтодермы (α -фетопротеин). Таким образом, полученные ИПСК способны дифференцироваться в клетки – производные трех зародышевых листков, что подтверждает их свойство плюрипотентности. Способность к спонтанной дифференцировке не зависела от способа получения линий ИПСК (Рисунок 4).

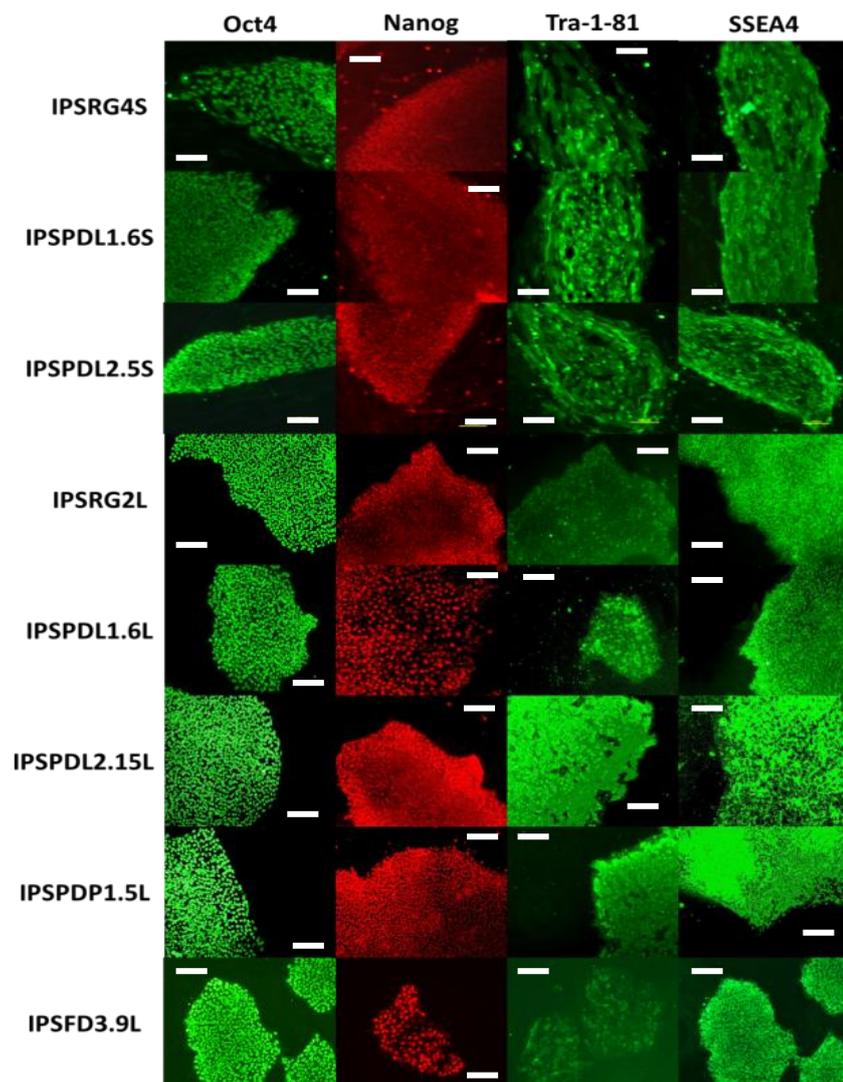


Рисунок 3. Оценка наличия маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, Tra-1-81 и SSEA4, в линиях ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, методом иммуноцитохимического окрашивания. IPSRG2L и IPSFD3.9L – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG4S - линия ИПСК, полученная из материала здорового донора с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L - линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.5S - линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L - линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции. Увеличение 100X, масштабная линейка 100мкм.

По сравнимым параметрам интеграционные и неинтеграционные ИПСК не отличаются друг от друга. В работе Soldner F. с соавторами проводили сравнение ИПСК от пациентов со спорадической формой БП до и после удаления трансгенов с помощью Cre-рекомбиназы. Различий на уровне морфологии и способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков обнаружено не было, однако при транскриптомном анализе было обнаружено, что ИПСК, трансгены из генома которых удалены, более сходны с ЭСК, чем ИПСК, имеющие вставки в геноме (Soldner F. et al., 2009). В работах, связанных с получением ИПСК с помощью инфекции лентивирусами или с помощью инфекции вирусом Сендай, не выявлены отличия между ЭСК и ИПСК по морфологии, экспрессии маркеров плюрипотентности и способности к дифференцировке в производные трех

зародышевых листков (Shaltouki A. et al., 2015; Liu G.-H. Et al., 2012; Seibler P. Et al., 2011), что согласуется с результатами, полученными в данной работе.

Все полученные клоны ИПСК были охарактеризованы согласно общепринятым стандартам. Все линии имели нормальный кариотип, линии, полученные от пациентов с БП, содержали в своем геноме соответствующие мутации. Все линии ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния на уровне, сопоставимом с ЭСК человека. Все линии ИПСК продемонстрировали способность к образованию эмбрионидных телец и последующей дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Таким образом, плюрипотентность линий ИПСК, полученных в ходе исследования, была подтверждена на молекулярном и функциональном уровнях.

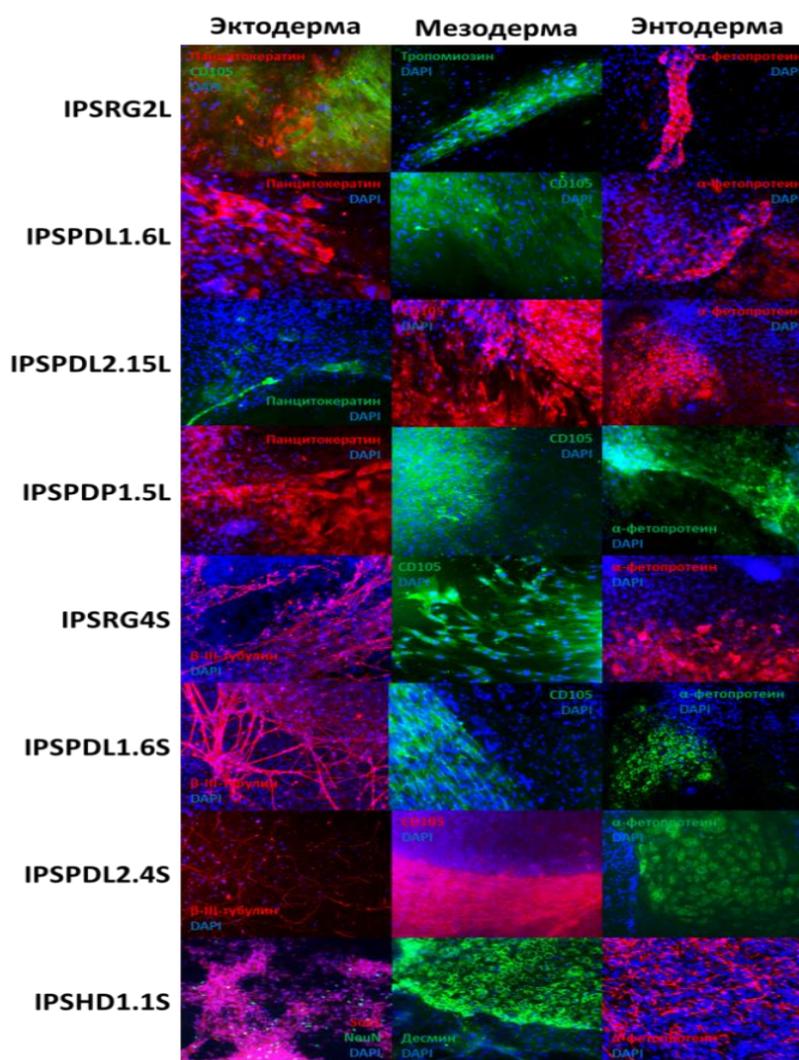


Рисунок 4. Анализ дифференцированных производных ИПСК на формирование клеток-производных, принадлежащих трем зародышевым листкам. Микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания дифференцированных ИПСК антителами к маркерам эктодермы (панцитокератин, β-III-тубулин, Sox1, NeuN), мезодермы (CD105, тропомиозин, десмин) и энтодермы (α-фетопротеин), увеличение 100X. IPSRG2L – линия ИПСК, полученная из материала здорового донора с помощью лентивирусной инфекции; IPSRG4S и IPSHD1.1S – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDL1.6L и IPSPDL2.15L – линии ИПСК, полученные из материала двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.4S – линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L – линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

Изучение влияния интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования на метилирование ДНК в ИПСК человека

Использование ретро или лентивирусной системы доставки генетического материала в клетки приводит к интеграции вирусных последовательностей в геном. Отсутствие специфических мест интеграции ретровирусов может приводить к активации ранее молчащих протоонкогенов и трансформации клеток (Thrasher A.J. et al., 2006) за счет непосредственного действия вирусных регуляторных последовательностей или изменения эпигенетического статуса района интеграции. Более того, в случае репрограммирования до плюрипотентного состояния, вводимые в геном клетки, гены транскрипционных факторов зачастую находятся под контролем убиквитарных промоторов (вирусный LTR, CMV, SFFV), которые инактивируются эпигенетически при достижении клеткой плюрипотентного состояния. Ответить на вопрос о влиянии интеграций в геном на метилирование ДНК можно с помощью полногеномного анализа метилирования изогенных линий ИПСК, полученных из материала одного донора с помощью интеграционного метода

репрограммирования (лентивирусная доставка 4х факторов) и неинтеграционного (доставка тех же факторов с помощью вируса Сендай).

Для анализа были использованы линии ИПСК, которые по своим морфологическим, молекулярно-биологическим, а также функциональным свойствам соответствовали критериям ИПСК. Были изучены 4 изогенные линии ИПСК, две - полученные интеграционным методом, две – неинтеграционным. Также были проанализированы две линии ИПСК от пациента с мутацией в гене *PARK8*, полученные интеграционным и неинтеграционным методами. Все линии клеток анализировали на ранних (11-15) и более поздних (22-27) пассажах. Также в исследование были включены нейрональные популяции, обогащенные TH-положительными нейронами, дифференцированные из ИПСК, полученных интеграционным методом от здорового донора (IPSRG2L) и двух пациентов с мутацией в гене *PARK8*.

Для сравнения полногеномных паттернов метилирования ДНК в ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, был проведен биоинформационный корреляционный анализ данных по метилированию ДНК (Рисунок 5). Наименьшая корреляция была обнаружена между нейронами и их исходными линиями ИПСК. Причем корреляция внутри каждого типа клеток значительно выше, несмотря на то, что в анализе присутствовал материал от двух доноров. Эти данные свидетельствуют о том, что различия в паттернах метилирования плюрипотентных клеток и их дифференцированных производных являются более глобальными, чем индивидуальные различия доноров клеточного материала и линий ИПСК. Исследованные линии ИПСК разделились на кластеры согласно их происхождению от конкретного донора. При этом линия IPSRG6L, полученная интеграционным методом и линия IPSRG4S, полученная неинтеграционным методом, коррелируют между собой сильнее, чем с линией IPSRG2L, полученной интеграционным методом от того же пациента. Результаты свидетельствуют о том, что метод репрограммирования не влияет на паттерн метилирования ДНК ИПСК, имеющих один генетический фон. Наиболее высокая корреляция наблюдалась между ранним (10-15) и поздним (22-27) пассажами одной линии ИПСК, что свидетельствует об индивидуальности каждой конкретной линии ИПСК.

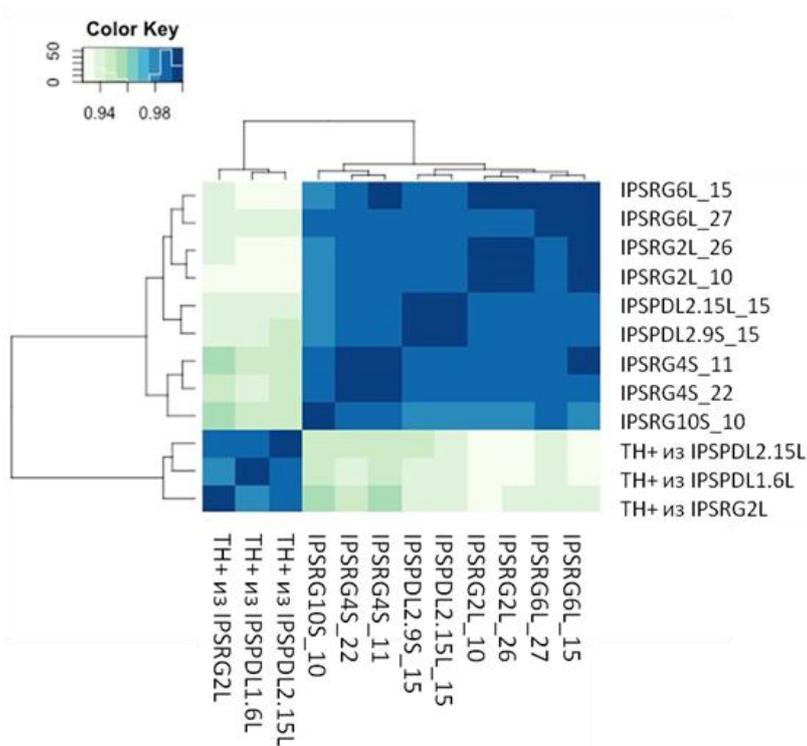


Рисунок 5. Корреляционный анализ (метод корреляций по Пирсону) полногеномных паттернов метилирования ДНК в линиях ИПСК, полученных интеграционным и неинтеграционным методами, и их дифференцированных производных. IPSRG2L, IPSRG6L, IPSRG4S, IPSRG10S - линии ИПСК, полученные от здорового донора, IPSPDL2.15L, IPSPDL2.9S- линии ИПСК, полученные от пациента с мутацией в гене *PARK8*, TH+ из IPSRG2L- дофаминергические нейроны, дифференцированные из линии ИПСК, полученной от здорового донора. TH+ из IPSPDL1.6L, TH+ из IPSPDL2.15L - дофаминергические нейроны, дифференцированные из линий ИПСК, полученных от пациентов с мутацией в гене *PARK8*. Числа после названия линий соответствуют пройденным ими пассажам.

Ранее в работе Bhutani K. с соавторами (Bhutani K. et al., 2016) были исследованы 9 изогенных линий ИПСК, полученных с помощью разных методов доставки факторов репрограммирования (лентивирусный вектор, вектор на основе вируса Сендай и синтетическая мРНК факторов

репрограммирования). Методами полногеномного анализа были проанализированы однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции и делеции. Было показано, что в репрограммированных клетках присутствуют однонуклеотидные полиморфизмы, которые не были обнаружены в исходной линии фибробластов, однако их паттерн и количество не зависели от способа доставки факторов репрограммирования. Проведенное в данной диссертационной работе исследование является первым исследованием, в ходе которого был проанализирован полногеномный паттерн метилирования ДНК в ИПСК, полученных различными методами. Проведенный метиломный анализ показал значительное сходство линий ИПСК, полученных различными методами, между собой, что позволяет нам утверждать, что в целом полногеномный паттерн метилирования не зависит от способа получения ИПСК, и любые полученные нами линии ИПСК могут применяться для моделирования БП, т.к. их плюрипотентный статус и полнота процесса репрограммирования полностью подтверждены.

Сравнительное исследование условий культивирования фибробластов и ИПСК, полученных от здоровых доноров и пациентов с БП

Фибробласты кожи, полученные от здоровых доноров и от пациентов с БП, имели одинаковую морфологию. Выход фибробластов из всех биоптатов начался через одинаковый промежуток времени после взятия биоматериала – 4-6 дней. При посеве клеток с видимой плотностью 50% фибробласты всех линий достигали видимой плотности 100% через 3-4 дня. Эти наблюдения позволяют сделать вывод, что наличие мутаций в генах *PARK8* и *PARK2* не влияет на способность фибробластов кожи расти в условиях *in vitro* и способность к миграции, а также на их выживаемость и пролиферативную активность.

Для подтверждения того, что полученные линии ИПСК были репрограммированы именно из клеток пациентов с БП, было проведено исследование по подтверждению наличия мутаций, описанных у доноров биологического материала.

При репрограммировании контрольных фибробластов и фибробластов, несущих мутации в генах *PARK8* и *PARK2* эффективность репрограммирования не зависела от наличия мутации, и составляла около 0,2% для всех исследованных линий фибробластов. Как в случае с индукцией плюрипотентности с помощью лентивирусных конструкций, так и при применении конструкций на основе вируса Сендай разница в динамике и эффективности репрограммирования между мутантными и контрольными клетками отсутствовала, что свидетельствует о том, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияли на процесс репрограммирования.

Различий в морфологии между ИПСК от здоровых доноров и от пациентов с мутациями в генах *PARK8* и *PARK2* обнаружено не было (Рисунок 1). Между линиями ИПСК наблюдались незначительные различия в пролиферативной активности (Рисунок 6). Такие различия, вероятно, обусловлены свойствами конкретного клона, из которого получена линия, а не наличием мутации или способом получения ИПСК, так как нельзя выделить группу «быстро» или «медленно» растущих клеток, объединенную по одному из этих параметров. Кроме того, как ИПСК, несущие мутации, так и ИПСК здоровых доноров экспрессировали все исследованные нами маркеры плюрипотентности (Рисунок 2 и 3). Таким образом, способность к поддержанию плюрипотентного состояния ИПСК не зависит наличия в клетках мутаций в генах *PARK8* и *PARK2*.

Из клонов ИПСК от всех трех пациентов и от здоровых доноров были получены эмбрионидные тельца, которые через 10-20 дней культивирования в суспензии были переведены на культивирование в адгезионной форме. Способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков была характерна для всех линий ИПСК (Рисунок 4). Потенциал к дифференцировке не зависел от способа получения ИПСК, а также на него не оказывали влияния мутации в генах *PARK8* и *PARK2*. Представленные результаты свидетельствуют о том, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияют на способность клеток к репрограммированию и на некоторые изученные свойства получаемых линий ИПСК. Другие авторы, исследующие наследственные формы БП на моделях, основанных на ИПСК, показали, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияли на процесс репрограммирования и свойства мутантных ИПСК (Reinhardt P. et al., 2013; Jiang H. et al., 2012). Кроме того, не было обнаружено влияния мутаций в генах, кодирующих PINK1 и α -синуклеин на свойства ИПСК (Seibler P. et al., 2011; Byers B. et al., 2011).

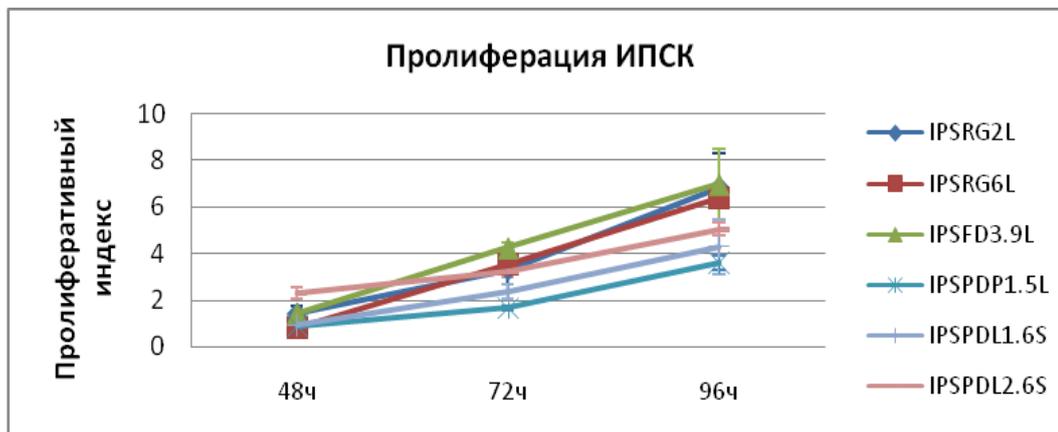


Рисунок 6. Кривые роста линий ИПСК, полученных от здоровых доноров и пациентов с БП интеграционным и неинтеграционным методами (для каждой точки n=3). IPSRG2L, IPSRG6L, IPSFD3.9L – линии ИПСК, полученные из материала здоровых доноров с помощью лентивирусной инфекции; IPSPDL1.6S и IPSPDL2.6S – линии ИПСК, полученные из материала от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, с помощью инфекции вирусом Сендай; IPSPDP1.5L – линия ИПСК, полученная из материала пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, с помощью лентивирусной инфекции.

Разработка эффективного и воспроизводимого протокола дифференцировки ИПСК в тирозингидроксилаза-положительные нейроны

При разработке протокола направленной дифференцировки мы опирались на протокол, опубликованный Kriks S., et al. в 2011 году (Kriks S. et al., 2011). Из протокола был исключен этап, связанный с использованием компонентов животного происхождения неопределенного состава. Для этого перед дифференцировкой ИПСК подрачивали в коммерчески доступной среде для плюрипотентных клеток человека mTeSR1, что потребовало изменения времени инкубации с различными факторами дифференцировки. Также нами был введен дополнительный этап пересева и/или заморозки нейрональных предшественников, что позволило банкировать нейрональные предшественники на разных стадиях дифференцировки и, таким образом, экономить дорогостоящие белковые факторы роста и дифференцировки. В опубликованном ранее протоколе используется 8 сред различного состава, тогда как в разработанном нами протоколе применяется всего 3 различных среды, что значительно упрощает применение данного протокола. Протокол дифференцировки состоял из трех этапов (Рисунок 7). Перед началом дифференцировки ИПСК человека культивировали до достижения 70-80% видимой плотности в среде mTeSR1 и на подложке Matrigel. Индукция нейрональной дифференцировки основана на двойном ингибировании сигнального пути SMAD (Chambers S.M. et al., 2009), поэтому на первом этапе среду клеткам заменяли на среду для нейрональной дифференцировки, содержащую 80 нг/мл Noggin, 10 мкМ SB431542, 4 мкМ дорсоморфина. Noggin, или его низкомолекулярный аналог – дорсоморфин, и SB431542 детерминируют дифференцировку клеток в сторону передней части нервной трубки, из которой впоследствии разовьются передние отделы центральной нервной системы. Используя описанный набор индукторов нейральной дифференцировки, нам удалось получить практически чистую популяцию нейрональных предшественников, фенотипически соответствующих клеткам нервной трубки (Рисунок 7, справа вверху). Высокая степень чистоты популяции позволяет избежать присутствующего во многих протоколах нейрональной дифференцировки этапа механического отбора нейральных розеток. В рассматриваемом протоколе данный трудоемкий и затратный по времени процесс заменен быстрым и дешевым пересевом нейральных предшественников с помощью раствора Версена, который позволяет получать гомогенную суспензию нейральных предшественников. На этой стадии образуются общие нейральные предшественники, которые способны при дальнейшей дифференцировке давать все типы нейронов и глиальных клеток. Такие предшественники легко переносят заморозку и могут храниться в жидком азоте.

За специализацию дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга отвечают *Sonichedgehog* (*Shh*) и фактор роста фибробластов 8 (*FGF8*). *Shh* выделяется донной пластинкой и отвечает за вентрализацию клеток среднего мозга, *FGF8* экспрессируется на границе между промежуточным и задним мозгом и образует каудо-ростральный градиент (Gilbert S.F., 2003; Wurst W., Bally-Cuif L., 2001). Поэтому для специализации нейрональных предшественников, полученных на первом этапе или извлеченных из заморозки, использовали высокие концентрации *Shh* и *FGF8*, 200нг/мл и 100нг/мл, соответственно. *Shh* в культуральной среде можно частично заменить низкомолекулярным веществом пурморфамином (Li, X.J., et al., 2008). В этом случае концентрацию рекомбинантного *Shh* в культуральной среде можно снизить до 100нг/мл, что представляется значительной экономией. По окончании данного этапа нейрональные предшественники меняются морфологически, можно видеть тело клетки и отросток, по длине не превышающий трех диаметров тела клетки (Рисунок 7, слева внизу). Такие нейрональные предшественники уже являются предшественниками нейронов среднего мозга и могут быть пересеяны раствором Версена и подвергнуты криоконсервации. Возможность сохранять в жидком азоте нейрональные предшественники на разных стадиях дифференцировки позволяет создать банк таких дифференцированных производных, а так же экономит время получения терминально дифференцированных клеток.

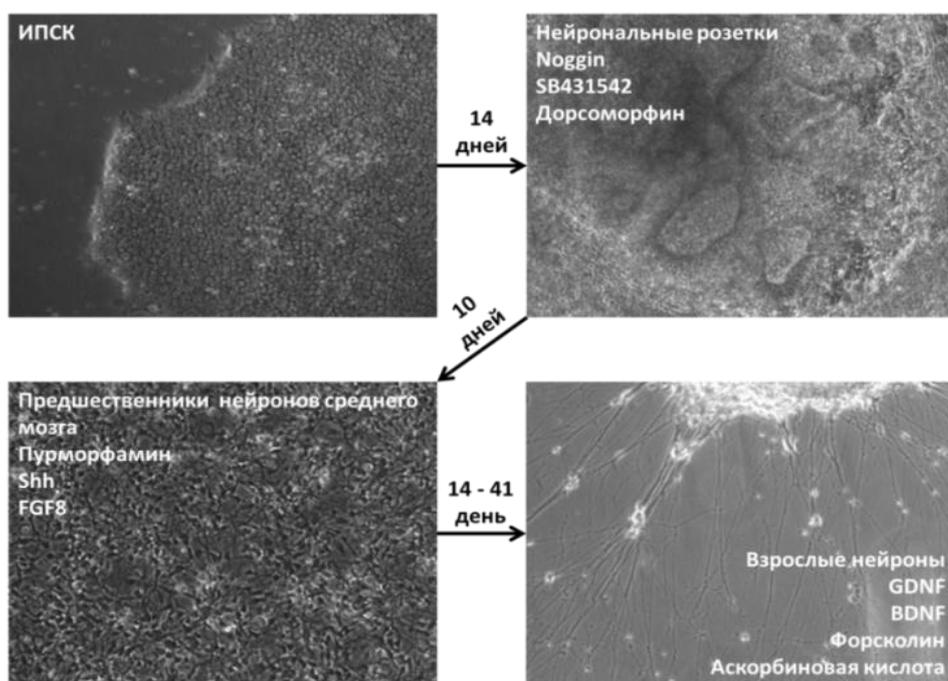


Рисунок 7. Схема протокола дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны. Сверху слева – недифференцированные ИПСК в среде mTeSR на подложке Matrigel; сверху справа – общие нейральные предшественники в конце первого этапа дифференцировки; снизу слева – нейрональные предшественники среднего мозга в конце второго этапа дифференцировки; снизу справа – взрослые нейроны на третьем этапе дифференцировки. Увеличение 100X.

На последнем этапе дифференцировки клетки культивируют в присутствии факторов BDNF и GDNF, которые способствуют созреванию нейронов. Также в среде для культивирования присутствует форсколин, обеспечивающий селективное выживание постмитотических клеток и уменьшающий, таким образом, количество глиальных клеток (Hochbaum D. et al., 2011). Аскорбиновая кислота применяется в качестве антиоксиданта. На этом этапе нейроны пересеяны уже быть не могут. Морфологически большинство нейронов на этом этапе представляют собой клетки с маленькой сомой и одним, двумя или несколькими отростками (Рисунок 7, справа внизу).

Разработанный протокол нейрональной дифференцировки занимает 38 дней, после этого клетки могут поддерживаться в среде для созревания в присутствии BDNF, GDNF и аскорбиновой кислоты еще как минимум 40 дней. На 38 день дифференцировки клетки анализировали различными молекулярно-биологическими методами. ПЦР - анализ показал, что полученные нейроны экспрессируют характерный для зрелых нейронов маркер – синаптофизин. БП развивается в зрелом и пожилом возрасте, и гибели подвергаются полностью зрелые постмитотические нейроны черной субстанции. Наличие экспрессии синаптофизина свидетельствует о присутствии в культуре зрелых нейронов, обладающих синапсами. Для изучения патогенеза БП наиболее интересно сравнить именно зрелые нейроны, имеющие мутацию, с нейронами не несущими ее, по их функциональным

свойствам. Также, полученные нами культуры нейронов экспрессируют маркер катехоламинергических, в частности, дофаминергических нейронов тирозингидроксилазу (Рисунок 8), которая катализирует превращение L-тирозина в L-ДОФА и лимитирует скорость всего процесса синтеза дофамина.

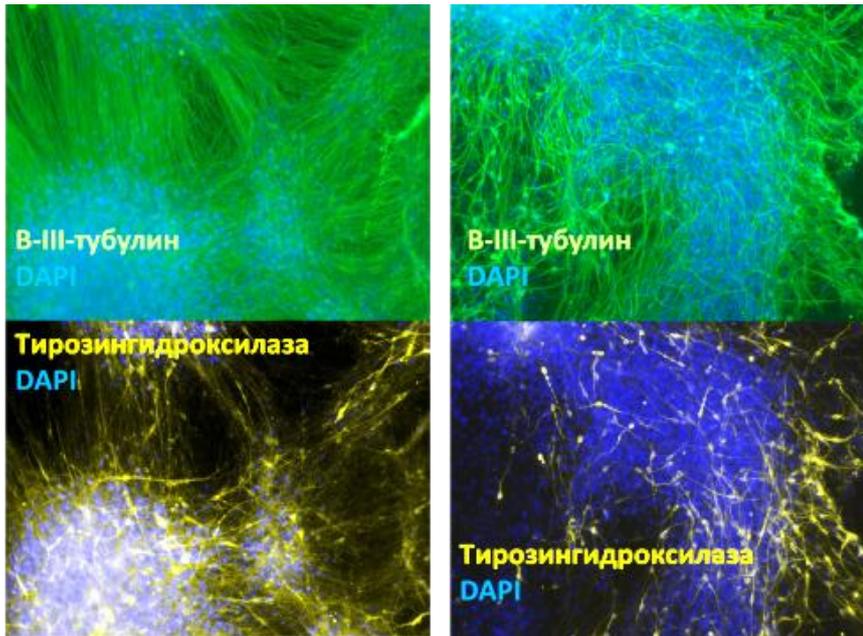


Рисунок 8. Анализ нейрональных культур на 38 день дифференцировки на экспрессию нейрональных маркеров методом иммуноцитохимии. Зеленый – β -III-тубулин, желтый – тирозингидроксилаза, синий – DAPI. Левый столбик – линия IPSPDL1.6L, несущая мутацию в гене *PARK8*, правый столбик – линия IPSRG2L, полученная от здорового донора. Увеличение 100X.

По сравнению с взятым за основу протоколом направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны (Kriks S. et al. 2011) примененный в работе протокол занимает на 4 дня больше времени (38 дней). Возможность хранить нейрональные предшественники позволяет создать банк предшественников от различных линий и использовать их по мере необходимости. Единичная дифференцировка $1-2 \times 10^6$ ИПСК позволяет получить 10×10^6 ранних нейральных предшественников (после первого этапа дифференцировки) или 40×10^6 нейрональных предшественников, коммитированных в дофаминергические нейроны (после второго этапа дифференцировки). Если для экспериментов использовать выведенные из заморозки клетки-предшественники, то продолжительность дифференцировки сократится до 24 дней (при использовании предшественников после первого этапа дифференцировки) или до 14 дней (при использовании предшественников после второго этапа дифференцировки). Кроме того, наличие банка предшественников позволяет в большей степени стандартизировать эксперименты с взрослыми нейронами, т.к. материал для ряда экспериментов будет происходить из одной дифференцировки одной порции клеток исходной линии ИПСК.

Изучение эффективности дифференцировки нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с БП

Определение эффективности нейрональной дифференцировки необходимо для использования дифференцированных производных ИПСК в качестве модели для изучения БП. Молекула клеточной адгезии, N-CAM (другое название CD56) локализуется на цитоплазматической мембране клетки, что упрощает процедуру иммуноцитохимического окрашивания. Кроме того, N-CAM является наиболее удобным нейральным маркером, т.к. присутствует на нейрональных и глиальных клетках, но не экспрессируется на эпителиальных клетках (Goridis, C. Et al., 1992). Примененный нами протокол дифференцировки позволяет получать культуру, практически свободную от клеток эпителиальной линии, поскольку выбранный нами маркер N-CAM позволяет отделить эпителиальные клетки от нейральных. ИПСК здорового донора и ИПСК пациентов с БП дифференцируются в нейральную линию с эффективностью около 90%, что подтверждается количественным подсчетом клеток, положительных на N-CAM, с помощью проточного цитофлуориметра. (Рисунок 9 вверху). Эффективность нейрональной дифференцировки оценивалась также и по наличию поверхностного маркера CD24 (Рисунок 9 внизу). Недавно было показано, что эта молекула клеточной адгезии экспрессируется на поверхности нейронов и нейрональных предшественников (Yuan S.H. et al.,

2011). Были получены популяции клеток, на 90% состоящие из CD24-положительных клеток как при дифференцировке ИПСК здоровых доноров, так и при дифференцировке ИПСК с мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*. Используемый нами протокол позволил получить нейрональные культуры в высокой степени обогащенный ТН – положительными клетками - до 90% (Рисунок 9). Достоверных различий в эффективности дифференцировки линий ИПСК, полученных интеграционным методом от здоровых доноров и от пациентов с БП, в дофаминергические (ТН-положительные) нейроны обнаружено не было. Такая эффективность дифференцировки позволяет осуществлять эксперименты на популяции нейронов, не беспокоясь о вопросе достоверной детекции выживаемости или смертности именно ТН – положительных нейронов, что является обязательным условием при применении клеточных культур в качестве тест-систем для скрининга лекарственных препаратов.

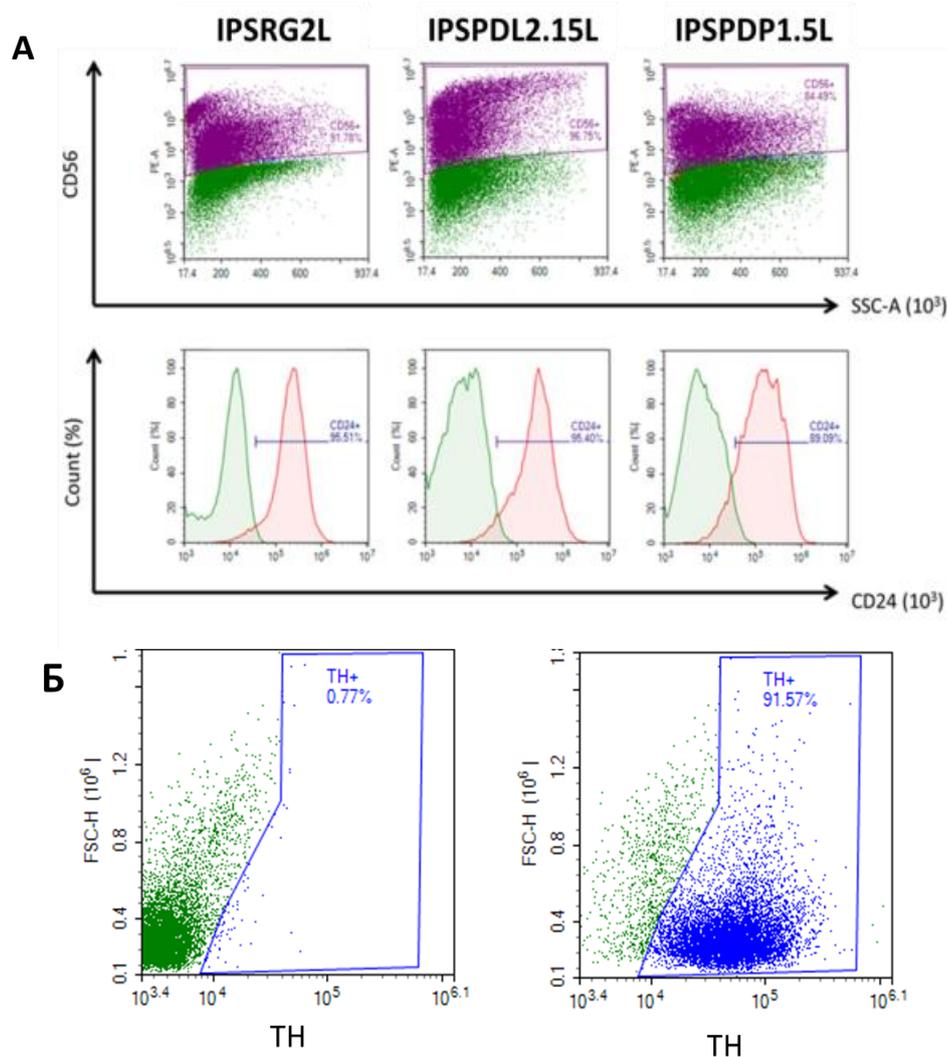


Рисунок 9. Результаты цитофлуориметрического анализа нейронов, дифференцированных из ИПСК, полученных из материала пациентов с БП и от здорового донора, на 65 день дифференцировки. А - CD56 (NCAM) – нейральная молекула клеточной адгезии (сверху), CD24 – молекула клеточной адгезии (снизу), IPSRG2L – линии ИПСК от здорового донора; IPSPDL2.15L - линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK8*, IPSPDP1.5L – линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*. Зеленый – контроль окрашивания (изотип-контроль), фиолетовый – клетки, положительно окрашенные антителами против N-CAM, красный – клетки, положительно окрашенные антителами против CD24. Б - клетки линии IPSPDP1.5L (пациент с БП, вызванной мутацией в гене *PARK2*), слева – изотип-контроль, справа – окрашивание антителами против тирозингидроксилазы.

Для доказательства функциональной активности получаемых нейрональных культур оценивали способность нейронов к спонтанному выбросу дофамина. На 34 день дифференцировки среду культивирования заменяли буферным раствором (10мМ HEPES, 114мМ NaCl, 5,3мМ KCl,

1мМ MgCl₂, 2мМ CaCl₂, 30мМ глюкозы, 1мМ глицина, 0,5мМ пирувата натрия) и инкубировали 30 минут в CO₂-инкубаторе, затем собирали кондиционированный буферный раствор и измеряли в нем содержание дофамина с помощью ион-парной обращеннофазовой хроматографии с амперометрической детекцией. Было показано, что все изученные линии клеток способны к спонтанному выбросу нейромедиатора.

Важным доказательством зрелости нейрональной популяции является отсутствие в ней пролиферации клеток. Только постмитотические нейроны могут считаться зрелыми и функциональными. Для доказательства полноты созревания нейронов при применении описанного протокола был проведен анализ фазы клеточного цикла в популяциях нейронов на 65 день дифференцировки с помощью проточного цитофлуориметра. Подавляющее большинство клеток (до 90%) в обеих исследованных линиях – IPSRG2L (получена из материала здорового донора) и IPSPDP1.5L (получена из материала пациента с мутацией в гене *PARK2*) - находится в G1 фазе (Рисунок 10), т.е. не делятся, что позволяет сделать вывод о том, что на данном этапе дифференцировки клетки являются зрелыми постмитотическими нейронами.

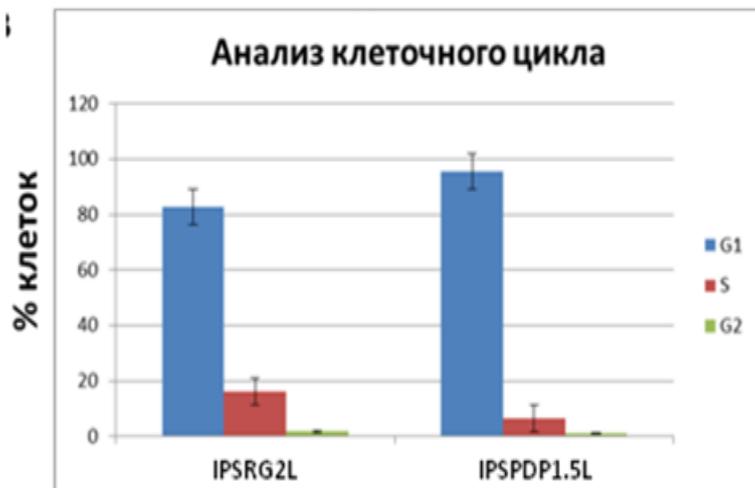


Рисунок 10. Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии. График отражает долю клеток находящихся в G1, S и G2 фазах клеточного цикла. Линия IPSRG2L получена от здорового донора, линия IPSPDP1.5L получена от пациента с мутацией в гене *PARK2*.

Наличие в дифференцированных нейронах экспрессии белка LRRK2 делает возможным использование полученных нами культур зрелых нейронов, обогащенных TH – положительными клетками, для изучения механизмов развития БП, вызванной мутацией в гене *PARK8*, *invitro* и для скрининга потенциальных лекарственных средств. Наличие экспрессии общих нейрональных маркеров (β -III-тубулин и синаптофизин) и маркера дофаминергических нейронов – тирозингидроксилазы, а также физиологическая активность (Лебедева О.С. et al., 2013) и способность к выработке дофамина получаемых постмитотических нейронов свидетельствуют о том, что нами разработан эффективный способ получения клеточной популяции для дальнейших исследований механизмов патогенеза БП.

Изучение дифференциальной экспрессии генов в нейрональных производных ИПСК, полученных от пациентов с БП и здорового донора

Мутации в генах *PARK8* и *PARK2* являются наиболее распространенными среди пациентов, страдающих от наследственных форм БП. Показано, что киназа LRRK2 и E3-убиквитин лигаза паркин являются участниками одного каскада реакций, ответственного за поддержание нормального функционирования митохондрий в клетке. (Smith W.W., et al., 2005). Кроме участия в этом каскаде оба белка имеют ряд партнеров по взаимодействию (в качестве примеров Kumar A. and Cookson M.R., 2011 и Yang F. et al., 2005). Функции и мишени LRRK2 и паркина пока еще в значительной мере не определены, таким образом определение различий в транскриптомах мутантных и здоровых нейронов может указать новые пути в изучении патогенеза БП, вызванной мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*.

Первоначально данные, полученные для каждой линии, были подвергнуты биоинформационному кластерному анализу по методу евклидовых расстояний (Рисунок 11). Было показано, что значительное влияние на полногеномный транскрипционный паттерн нейрональных

культур оказывает срок дифференцировки. Дальнейший анализ проводили, сравнивая между собой данные, полученные на одном сроке дифференцировки нейронов на культурах здорового донора и пациентов с БП (в анализируемую группу помещали либо данные от всех пациентов с БП, либо разделяли по имеющимся мутациям). Кроме этого, отдельно анализировали данные по линиям, полученным от здорового донора, на разных сроках дифференцировки с целью изучить процессы взросления и старения нейрональных культур *in vitro*.

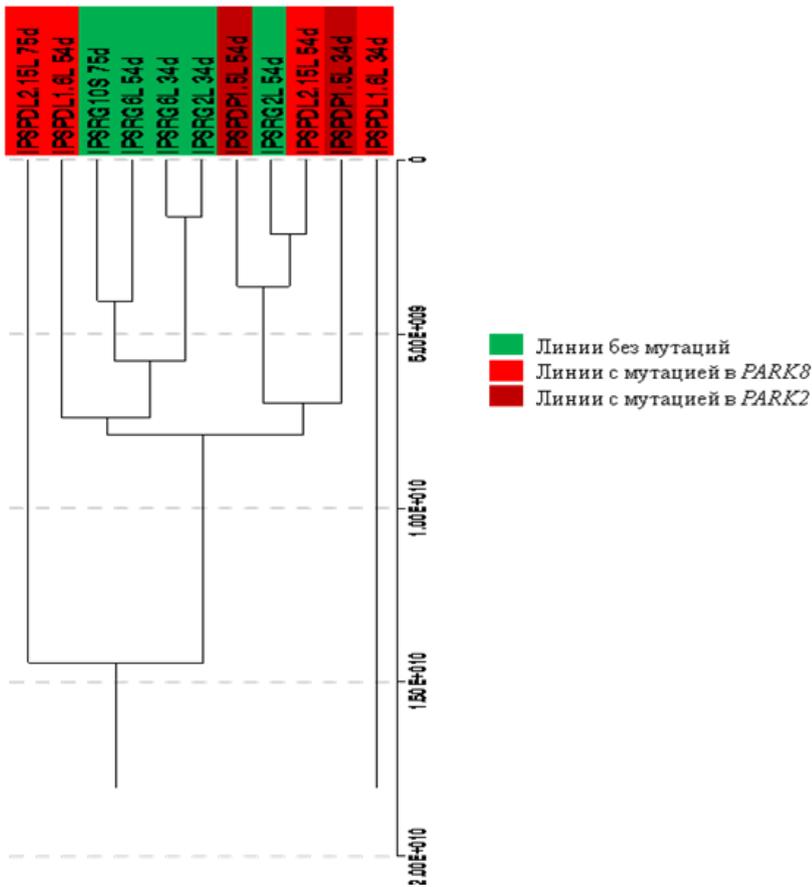


Рисунок 11. Кластерный анализ по методу евклидовых расстояний. IPSRG2L, IPSRG6L– линии ИПСК от здорового донора, полученные интеграционным методом; IPSRG10S - линия ИПСК от здорового донора, полученная неинтеграционным методом; IPSPDL1.6L, IPSPDL2.15L– линии ИПСК от двух пациентов с БП, имеющих мутацию в гене *PARK8*, полученные интеграционным методом; IPSPDP1.5L– линия ИПСК от пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, полученная интеграционным методом.

При сравнении нейронов, полученных из ИПСК здорового донора, на разных сроках дифференцировки было обнаружено, что на 34 день дифференцировки в культурах нейронов повышена экспрессия генов, участвующих в клеточном цикле и митозе, по сравнению с культурами на 54 и 75 дни дифференцировки. В культурах на 54 день дифференцировки повышена экспрессия генов, ответственных за синаптическую пластичность, передачу нервного импульса, рост нейритов. Мы предполагаем, что на 34 день дифференцировки в культуре все еще присутствуют не полностью зрелые нейрональные предшественники, способные к делению. На 54 день дифференцировки культура состоит из полностью зрелых нейронов, и предшественники, которые сохранялись в культуре на 34 день дифференцировки, прошли процесс созревания до постмитотических взрослых нейронов. В культурах на 75 день дифференцировки повышается экспрессия генов, участвующих в работе лизосом и фагосом, что свидетельствует о том, что в нейронах на таком позднем сроке культивирования начинаются процессы деградации и апоптоза.

В нейронах, полученных из ИПСК от пациентов с мутацией в гене *PARK8*, на 34 день дифференцировки повышенную экспрессию имели гены, ответственные за развитие нейронов и синтез нейромедиаторов. На этом же сроке в контрольных здоровых нейронах была повышена экспрессия генов, продукты которых участвуют в клеточном цикле и делении клетки. На 54 день дифференцировки в мутантных нейронах достоверно повышается экспрессия генов, связанных с функционированием фагосом и лизосом, в то время как в нейронах дикого типа была повышена экспрессия генов ответственных за синаптическую пластичность, передачу нервного импульса, рост нейритов. Эти результаты говорят о том, что, вероятно, у мутантных нейронов созревание

происходит быстрее и гибель нейронов начинается раньше, чем у контрольных нейронов, дифференцированных из ИПСК здорового донора.

При сравнении здоровых нейронов и нейронов, полученных из ИПСК от пациента с мутацией в гене *PARK2*, на 34 день дифференцировки, было показано изменение экспрессии генов принадлежащих к различным кластерам. В виду того, что паркин участвует в поддержании гомеостаза митохондрий в клетке, нам показалось особенно интересным, что в мутантных клетках повышается экспрессия 65 генов, участвующих в функционировании митохондрии. Эти гены вовлечены в нормальную работу митохондрии: ферменты цикла Кребса, некоторые тРНК-синтазы, ферменты метаболизма жирных кислот. Мы предполагаем, что таким образом нейроны с мутацией в гене *PARK2* реагируют на увеличение количества некорректно функционирующих митохондрий. Одной из основных функций E3-убиквитин лигазы паркина является убиквитинилирование белков внешней мембраны митохондрий, утративших потенциал. Такие митохондрии не способны осуществлять окислительное фосфорилирование и электроны из дыхательной цепи сбрасываются на кислород с образованием губительных для клетки активных форм кислорода. Маркированные убиквитином митохондрии захватываются аутофагосомами и перевариваются в процессе митофагии. При наличии мутации в гене *PARK2* дефектные митохондрии не подвергаются митофагии, накапливаются в клетке, продолжая частично функционировать и требуя синтеза дополнительного количества белков. Со временем избыточное количество не утилизируемых митохондрий, вызывают окислительный стресс, что приводит к апоптозу.

При сравнении на 54 день дифференцировки популяций клеток от здорового донора и пациента с БП, имеющего мутацию в гене *PARK2*, было обнаружено, что в мутантных клетках активно идет клеточное деление и метаболизм осуществляется за счет гликолиза, что не характерно для постмитотических нейронов. У пациента повышена в 2 раза экспрессия таких генов гликолитического пути, как глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (*GAPDH*), енолаза 2 (*ENO2*), триозофосфатизомераза (*TPH1*), глюкозо-6-фосфат изомераза (*GPI*), фосфоглицератмутаза (*PGAM1*), альдолаза (*ALDOA*, *ALDOC*), гексокиназа (*HK2*). Гликолиз активно используют делящиеся и дифференцирующиеся клетки, т.к. этот путь позволяет, как получать энергию в виде АТФ, так и строительный материал для анаболических процессов в клетке. Постмитотические нейроны преимущественно получают АТФ с помощью более эффективного процесса окислительного фосфорилирования (Gusdon A.M., Chu C.T., 2011). Повышение экспрессии генов ферментов гликолитического пути при БП не описано в литературе и косвенно подтверждает наши выводы о накоплении некорректно работающих митохондрий с ранних стадий дифференцировки нейронов. Активация гликолитического пути происходит из-за накопления в мутантных клетках поврежденных митохондрий, которые не могут в достаточной степени осуществлять окислительное фосфорилирование.

Транскриптомный анализ показал очевидные различия в паттерне экспрессии генов в нейронах с разными мутациями, а также выявил ранее не описанные молекулярные механизмы патологии, связанные с процессами дыхания. Дальнейшее изучение данной модели позволит более полно раскрыть механизмы патогенеза БП, вызванной мутациями в генах *PARK8* и *PARK2*.

Заключение

Существующая терапия нейродегенеративных заболеваний носит симптоматический и паллиативный характер и направлена на устранение симптомов заболевания, а на поздних стадиях на уменьшение страданий пациента. Методов лечения, способных остановить развитие болезни или излечить пациента, не существует. Положение осложняется отсутствием адекватных модельных объектов для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний и скрининга новых лекарственных препаратов. Разработка модельных систем для изучения нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БП, является перспективной и актуальной задачей.

Протоколы направленной дифференцировки ИПСК в целевой тип клеток требуют проверки и оптимизации в условиях конкретной лаборатории, что является трудоемким и длительным процессом. Эффективность большинства существующих протоколов направленной дифференцировки по-прежнему невысока. Клеточные модели БП, основанные на зрелых нейронах, будут информативны лишь в случае получения популяции нейронов, в значительной степени

обогащенной целевым типом клеток (ТН-положительными нейронами). Такие культуры могут быть применены для полногеномных исследований, а также они значительно упрощают и электрофизиологические, протеомные и фармакологические исследования.

В ходе выполнения диссертационного исследования был создан и охарактеризован первый в России набор ИПСК пациентов с наследственными формами БП. В коллекции мутантных линий присутствуют линии от двух пациентов с аутосомно-доминантной мутацией G2019S в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, и от одного пациента, который является компаунд-гетерозиготным носителем аутосомно-рецессивных мутаций в гене *PARK2*, кодирующем E3-убиквитинлигазу паркин. ИПСК из фибробластов кожи пациентов были получены двумя методами – интеграционным и неинтеграционным. Методом полногеномного анализа метилирования ДНК было показано отсутствие достоверных различий метилирования ДНК недифференцированных ИПСК, полученных из материала одного пациента различными методами. В диссертационном исследовании была продемонстрирована способность ИПСК, несущих мутации, связанные с развитием БП, дифференцироваться в ТН-положительные нейроны независимо от наличия мутации. Эффективность дифференцировки достигает 70-90%, что позволяет использовать такие обогащенные популяции в практически любых исследованиях, без необходимости дополнительной очистки популяции от примесных типов клеток. При усовершенствовании протокола направленной дифференцировки в него был внесен дополнительный этап пересева коммитированных нейрональных предшественников, при этом нейрональные предшественники могут быть заморожены, что позволяет сохранять такие клетки в большом количестве и уменьшать затраты времени и дорогостоящих реактивов.

В ходе диссертационного исследования был проведен полногеномный транскриптомный анализ нейрональных популяций, обогащенных ТН - положительными нейронами, который выявил ряд различий между мутантными и не мутантными клетками. Наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными генами при БП являются метаболические пути, связанные с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом. Этот первый эксперимент с применением разработанной модели показывает возможность её использования в исследовании патогенеза заболевания, например при изучении функционирования митохондрий при развитии БП, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов.

Выводы

1. Наличие генетических мутаций, ассоциированных с болезнью Паркинсона (G2019S в гене *PARK8*; IVS1+1G/A и делеция 202-203 (AG) в гене *PARK2*), не влияет на эффективность и качество генетического репрограммирования пациент-специфических дермальных фибробластов.

2. Впервые показано, что использование интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования не приводит к статистически значимому изменению паттерна метилирования ДНК на полногеномном уровне, а также не влияет на эффективность репрограммирования пациент-специфических дермальных фибробластов.

3. Разработанный оригинальный протокол направленной дифференцировки ИПСК позволяет воспроизводимо получать популяцию постмитотических нейронов, содержащую до 80% дофаминергических нейронов.

4. Впервые показано, что на уровне транскриптома в дофаминергических нейронах, дифференцированных из мутантных ИПСК, наблюдаются нарушения, связанные с функциями мутированных генов (*PARK8* и *PARK2*). Таким образом, созданы генетические системы для изучения БП *in vitro*.

5. Создан банк ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с семейной формой БП (мутации в генах *PARK8* и *PARK2*) и из фибробластов здоровых доноров интеграционным и неинтеграционным методами.

Исследование было поддержано грантом Министерства образования и науки РФ (ГК № 14.604.21.0115, идентификатор RFMEFI60414X0115) и грантом Президиума РАН "Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий".

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих перечню ВАК:

1. **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2011. - Т. 5. - №4. - С. 37-45.
2. Некрасов Е.Д., **Лебедева О.С.**, Честков И.В., Сюсина М.А., Федотова Е.Ю., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2011. - Т. VI. - №4. - С. 82-88.
3. Некрасов Е.Д., **Лебедева О.С.**, Васина Е.М., Богомазова А.Н., Честков И.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2012. - Т. 6. - №4. - С. 30-35.
4. **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. // *Нейрохимия*. – 2013. – Т. 3. – С. 233-241. (Английская версия: Lebedeva O.S., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Mukhina I.V., Vedunova M.V., Usova O.V., Stavrovskaya A. V., Yamshchikova N.G., Fedotova E.Yu., Grivennikov I.A., Khaspekov L.G., Ilarioshkin S.N. The morphofunctional properties of induced pluripotent stem cells derived from human skin fibroblasts and differentiated to dopaminergic neurons. // *Neurochem. J.* – 2013. – Vol. 7. - P. 207-214).
5. Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Grivennikov I.A., **Lebedeva O.S.**, Klyushnikov S.A., Chestkov I.V., Fedotova E.Yu., Zakharova M.N., Ilarioshkin S.N. A platform for studies of Huntington's disease and other neurodegenerative disorders on the basis of induced pluripotent stem cells. // *J. Huntington's Dis.* – 2013. – 2. - P. 16-17.
6. Богомазова А. Н., Васина Е. М., Киселев С. Л., Лагарькова М. А., **Лебедева О. С.**, Некрасов Е. Д., Панова А. В., Филоненко Е. С., Хомякова Е. А., Цховребова Л. В., Честков И. В., Шутова М. В. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования. // *Генетика*. - 2015. - Т. 51. - №4. - С. 466-478.
7. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., **Lebedeva O.S.**, Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Sulдина L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Yu., Ilarioshkin S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // *Mol. Neurodegener.* - 2016. - V. 11. - № 1. - P. 27-42.

Публикации в других изданиях:

1. **Лебедева О.С.**, Гривенников И.А., Лагарькова М.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: получение и перспективы. // *Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Тачука*. – Москва. - МАКС Пресс. - 2011.
2. **Лебедева О.С.**, Сюсина М.А., Иллариошкин С.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А. Перспективы и проблемы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в исследовании нейродегенеративных заболеваний. // *Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Тачука*. – Москва. - МАКС Пресс. - 2012.
3. Иллариошкин С.Н., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А., **Лебедева О.С.** Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в неврологии. // *Современные мед. Технологии*. – 2013. - №10. - С. 55-59.
4. **Лебедева О.С.**, Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. Получение и характеристика

клеточной модели болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. // Сборник «Стволовые клетки и регенеративная медицина» / под ред. В.А. Ткачука. – Москва. - МАКС Пресс. - 2014.

5. Holmqvist S., Lehtonen S., 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., Roybon L. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. // npj Parkinson's disease. – 2016. – V. 2. – online.

Тезисы докладов и материалы конференций (избранное):

1. **Лебедева О.С.**, Честков И.В., Некрасов Е.Д., Сюсина М.А., Васина Е.М., Иллариошкин С.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона). // VIII Международная конференция “Молекулярная генетика соматических клеток” - Звенигород, Россия; 2011, С. 54.
2. **Lebedeva O. S.**, Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Nekrasov E.D., Susina M.A., Chestkov I.V., Vassina E.M., Illarioshkin S.N., Grivennikov I.A. Establishment of iPSC lines from Parkinson's diseased patients for molecular mechanisms study. // ISSCR 10th Annual meeting, Yokohama, Japan; 2012 V. 1, p. 22.
3. Nekrasov E.D., **Lebedeva O.S.**, Chestkov I.V., Susina M.A., Grivennikov I.A., Illarioshkin S.N., Kiselev S.L., Lagarkova M.A. Induced pluripotent stem cells based model system for studying Huntington's disease. // ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan; 2012.
4. 6-я Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Россия, Московская область, п. Клязьма, 09-13 ноября 2015 г. И.А. Гривенников, Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, В.В. Симонова, С.Н. Иллариошкин, О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова, В.З. Тарантул. «Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки: новая веха в развитии нейрофармакологии и нейробиологии».
5. Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Некрасов Е.Д., **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А. Перспективы и проблемы применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в неврологии. // Тезисы доклада на III конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» - Москва, Россия; 2011, с. 36-37.
6. Гривенников И.А., Антонов С.А., Арсеньева Е.Л., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Кобылянский А.Г., Лагарькова М.А., **Лебедева О.С.**, Мануилова Е.С., Новосадова Е.В. Клеточные технологии для поиска и изучения механизмов действия новых лекарственных препаратов. // Тезисы доклада на V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» - Петрозаводск, Россия; 2011, с. 97.
7. **Lebedeva O. S.**, Vassina E.M., Nekrasov E.D., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Illarioshkin S.N., Kiselev S.L., Grivennikov I.A., Lagarkova M.A. Development of Parkinson's disease cell model based on diseased iPSCs – derived mature neurons. // Stem cell models of Neuronal regeneration and disease – Dresden, Germany, 2016. – P.75.
8. Lehtonen S., Puttonen K., Koskivi M., Kocianova R., **Lebedeva O. S.**, Oksanen M., Gao Y., Maderycova Z., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Koistinaho J. Characterization of LRRK2 mutant iPSC-derived dopaminergic neurons and astrocytes. // Stem cell models of Neuronal regeneration and disease – Dresden, Germany, 2016. – P.71.

Патенты:

Патент №2458983. Приоритет от 18.07.2011. Зарегистрирован 20.08.2012. «Способ получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов пациентов с болезнью Хантингтона» / Гривенников И.А., **Лебедева О.С.**, Новосадова Е.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Ключников С.А.

Для заметок