

На правах рукописи

**МАЛАНХАНОВА**  
**Туяна Баировна**

**СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА  
КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) в лаборатории эпигенетики развития, г. Новосибирск

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией эпигенетики развития  
**Закиян Сурен Минасович**

**Официальные оппоненты:** **Салмина Алла Борисовна**  
доктор медицинских наук, профессор, проректор по инновационному развитию и международной деятельности Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск  
**Кулемзин Сергей Викторович**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,  
тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.  
e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Болезнь Хантингтона (БХ) – это нейродегенеративное наследственное заболевание, вызванное увеличением числа тринуклеотидных триплетов CAG в первом экзоне гена *HTT*, который кодирует белок хантингтин. Вследствие такого нарушения мутантный хантингтин содержит удлиненный полиглутаминовый тракт, из-за чего белок приобретает неправильную конформацию, не выполняет свои функции и оказывает токсический эффект на срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума. Более того, исследователями доказана прямая корреляция между числом триплетов CAG и временем появления первых симптомов БХ. Потеря СШН приводит к двигательным дисфункциям, когнитивным расстройствам и, в конечном счете, смерти пациента.

Для изучения молекулярных аспектов развития БХ необходимы модельные системы, которые наиболее точно воспроизводят фенотип заболевания. Модели на основе культивируемых клеток человека являются перспективным объектом для таких исследований. Наиболее точную картину патологических процессов, происходящих при БХ, можно создать с помощью нейрональных производных, в частности СШН, полученных при направленной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека. Разработка технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открыла новые возможности моделирования заболеваний, поскольку стало возможным получение клеточных моделей от конкретного пациента. Однако, наличие однонуклеотидных полиморфизмов в геноме клеток от разных пациентов может вносить существенный вклад в результаты исследований. Таким образом, необходима большая выборка клеток от пациентов и «здоровых» доноров, что значительно усложняет работы по изучению заболевания.

Решением данной проблемы может быть создание изогенных линий клеток. Такие линии обеспечивают адекватный «отрицательный» контроль, поскольку имеют идентичный генетический фон и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием мутации, вызывающей конкретное заболевание. Для создания изогенных линий может быть использован инструмент для редактирования генов CRISPR/Cas9, который позволяет эффективно и специфично вносить модификации в геном клеток. Так, изогенную пару клеточных линий можно получить двумя способами: первый способ – исправить мутацию в пациент-специфичных клетках, второй – внести мутацию, вызывающую заболевание, в «здоровые» клетки. Изогенные клеточные модели являются релевантной и перспективной платформой для тестирования лекарственных препаратов, а также изучения молекулярных основ развития БХ.

**Цель работы** – создать и охарактеризовать модельную систему болезни Хантингтона на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

### **Задачи:**

1. Создать систему для внесения удлиненного тракта триплетов CAG (>36) в экзон 1 гена *HTT* человека на основе донорной плазмиды и плазмиды, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и оценить эффективность ее работы на клетках линии HEK293.

2. Внести удлиненный тракт триплетов CAG в экзон 1 гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека и репрограммировать клоны внесенной мутацией к плюрипотентному состоянию.
3. Провести характеристику клонов ИПСК с мутацией в гене *HTT* с помощью стандартных тестов на плюрипотентность.
4. Провести направленную дифференцировку ИПСК с мутацией в гене *HTT* и контрольной изогенной линии ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума и охарактеризовать мутантный фенотип полученных нейронов.

**Научная новизна работы.** Впервые получена клеточная система, моделирующая болезнь Хантингтона, на основе линий ИПСК, несущих 40/53 и 69/22 повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*, и изогенной линии ИПСК без мутации. Удлиненный тракт повторов CAG, вызывающий данное заболевание, был внесен с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации с донорной матрицей, которая была сконструирована в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Подтвержден плюрипотентный статус полученных клеточных линий с помощью ряда стандартных тестов. Кроме того, была проведена проверка активности CRISPR/Cas9 в нецелевых локусах генома клеток с помощью секвенирования по Сэнгеру. По протоколу, разработанному в лаборатории эпигенетики развития, проведена направленная дифференцировка полученных клеточных линий, изогенного контроля и положительного контроля – линия пациент-специфичных ИПСК с 47/17 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT*, в СШН стриатума. Полученные нейроны экспрессировали основные маркеры зрелых нейронов стриатума и воспроизводили патологический фенотип БХ. Более того, были выявлены новые ультраструктурные особенности мутантных нейронов с помощью электронной микроскопии.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученная изогенная модельная система позволит проводить комплексное изучение молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития БХ, а также скрининговые тестирования фармакологических препаратов. Кроме того, научные результаты, стратегии и подходы, использованные в данной работе, могут быть применены при создании изогенных клеточных моделей целого ряда полиглутаминовых заболеваний человека, поскольку для этого необходима только замена плечей гомологии донорного вектора и подбор нового протоспейсера для действия системы CRISPR/Cas9.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Удлиненный тракт триплетов CAG (>36) внесен в первый экзон гена *HTT* культивируемых клеток человека в результате CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором.
2. Срединные шипиковые нейроны стриатума, полученные при направленной дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с удлиненным трактом триплетов CAG (>36) в гене *HTT*, являются моделью для изучения болезни Хантингтона.

**Вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Донорная последовательность с удлиненным трактом повторов CAG была сконструирована к.б.н. М.А. Сорокиным. Определение числа повторов CAG в первом экзоне гена

*HTT* в полученных клетках осуществлялось к.б.н. Н.Ю. Абрамычевой. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводился совместно с к.б.н. Е.В. Григорьевой и к.б.н. С.И. Байбородиныным. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа осуществлялся к.б.н. Ю.В. Мининой. Подготовка материала и электронномикроскопический анализ был выполнен Л.А. Сульдиной.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на зарубежных российских конференциях с международным участием, среди которых: V Международная конференция «Постгеном'2018», г. Казань; Международный конгресс CRISPR-2018, г. Новосибирск; CRISPR: From Biology to Biotechnology and Novel Therapeutics, г. Ситжес, Испания. По теме диссертации опубликовано пять работ в рецензируемых научных журналах из списка ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 118 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Конструирование вектора для экспрессии элементов системы CRISPR/Cas9.** Плазмидный вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene plasmid #48138) был приобретен в депозитории Addgene. Последовательность спейсера была клонирована в вектор как описано ранее (Ran et al., 2013).

**Модификация донорной плазмиды.** Для гомологичной рекомбинации был использован плазмидный вектор, полученный ранее в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. В 5'-плечо гомологии вносили синонимичную однонуклеотидную замену с помощью методов молекулярного клонирования.

**Химическая трансфекция с помощью полиэтиленимина (PEI).** Трансфекцию клеток с помощью полиэтиленимина PEI (Santa Cruz) проводили согласно протоколу производителя.

**Электропорация.** Электропорацию проводили с помощью прибора Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя при следующих параметрах: 1400 В, 20 мс, 2 импульса.

**Вестерн-блот.** Вестерн-блот проводили согласно протоколу, описанному ранее (Morozova et al., 2018).

**Генотипирование экспансии тандемных CAG-повторов в первом экзоне гена *HTT* методом фрагментного анализа.** Определение числа повторов CAG проводили согласно протоколу, описанному ранее (Grigor'eva et al., 2019).

**Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов кожи человека.** Перепрограммирование фибробластов к плюрипотентному состоянию проводили согласно протоколу, описанному ранее (Okita et al., 2011, Okita et al., 2013).

**Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы.** Гистохимическое выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы проводили согласно методу, описанному ранее (Pain et al., 1996).

**Анализ кариотипа.** Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа проводили согласно протоколу, описанному ранее (Grigor'eva et al., 2019).

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Иммунофлуоресцентное окрашивание осуществляли стандартным способом (Grigor'eva et al., 2019).

**Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*.** Дифференцировка в эмбрионидных тельцах проводилась по стандартному протоколу (Grigor'eva et al., 2019).

**Выделение РНК и синтез кДНК.** РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Синтез кДНК проводили с помощью набора SuperScript III First Strand (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя.

**Количественная ПЦР в реальном времени.** ПЦР проводили с помощью реагента 2×HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс) (Grigor'eva et al., 2019).

**Направленная дифференцировка ИПСК в СШН.** Дифференцировку ИПСК в СШН проводили согласно протоколу, описанному ранее (Григорьева, 2017).

**Формирование нейтральных розеток.** Дифференцировку ИПСК в нейтральные розетки проводили согласно протоколу, описанному ранее (Ma et al., 2008).

**Тест на чувствительность клеток к удалению BDNF.** Предшественники СШН культивировали в среде Neurobasal с 1% БСА, 100 ед/мл раствора пенициллин/100 мкг/мл стрептомицина в течение 24 ч. Затем клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител против активированной каспазы-3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Дизайн и проверка системы для внесения мутации в ген *HTT* человека

#### 1.1. Выбор последовательности протоспейсера для действия CRISPR/Cas9 в локусе *HTT* и внесение синонимичной замены в последовательность донорного вектора

Донорные векторы содержали длинные плечи гомологии к последовательности 1 экзона гена *HTT*: 5'-плечо – 470 п.н., 3'-плечо – 1358 п.н., и различались только числом повторов CAG, которые были фланкированы плечами гомологии. Так, донорные плазмиды содержали от 39 до 215 повторов CAG.

Последовательность протоспейсера для действия системы CRISPR/Cas9 была выбрана в 5'-плече гомологии и наиболее близко к тракту повторов CAG в гене *HTT*. Для “защиты” донорного вектора и рекомбинантного локуса от гидролиза системой CRISPR/Cas9 выбирали протоспейсер таким образом, чтобы была возможность внесения синонимичной замены в PAM 5'-NGG-3' в последовательности донорной плазмиды для изменения канонической последовательности PAM на неканоническую, что снизит вероятность гидролиза как донорной плазмиды, так и локуса *HTT* после рекомбинации (Zhang et al., 2014). Так, был выбран протоспейсер в 5'-плече гомологии локуса *HTT* на расстоянии 20 п.н. от тракта повторов CAG. С помощью методов молекулярного клонирования была внесена синонимичная замена C>T (в некодирующей цепи – G>A) в 5'-плечо гомологии донорных плазмид, содержащих 69 и 148 повторов CAG (плазмида Donor-*HTT*-69Q и Donor-*HTT*-148Q). Эта замена изменила каноническую последовательность PAM 5'-AGG-3' на неканоническую 5'-AAG-3', которая значительно снижает нуклеазную активность Cas9.

#### 1.2. Проверка системы для внесения мутации в ген *HTT* на клетках линии HEK293FT

Для проверки эффективности полученной системы клетки линии HEK293FT трансфицировали плазмидами Donor-*HTT*-69Q/pX458-*HTT* и Donor-*HTT*-148Q/pX458-*HTT*. Было проанализировано 136 клонов клеток, из которых 2 клон,

HEK293FT-F1 и HEK293FT-B5, имели продукты с большим молекулярным весом, в отличие от продукта ПЦР с участка *HTT* дикого типа. При этом, клон HEK293FT-F1 имел гомозиготную вставку удлиненного тракта повторов, а клон HEK293FT-B5 – гетерозиготную (Рисунок 1А).

После секвенирования по Сэнгеру участка внесения двуникового разрыва у клона с гомозиготной вставкой удлиненного тракта повторов HEK293FT-F1 присутствует целевая замена С>Т и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК; у клона с гетерозиготной вставкой удлиненного тракта повторов HEK293FT-B5 в аллеле с удлиненным трактом повторов так же присутствует замена и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК. Однако, в аллеле с нормальным числом повторов СAG в точке разрыва ДНК была обнаружена делеция аденина (Рисунок 1Б). Таким образом, наличие однонуклеотидной замены предотвратило повторный гидролиз протоспейсера и, соответственно, возникновение нецелевых модификаций.

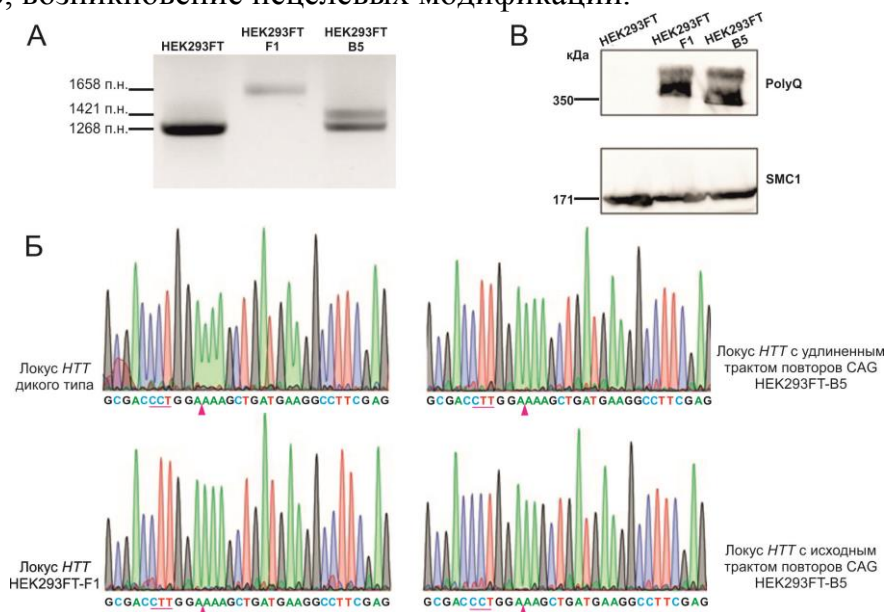


Рисунок 1. Результаты проверки системы для редактирования локуса *HTT* на клетках линии HEK293FT.

(А) Анализ клонов клеток на наличие вставки удлиненного тракта повторов СAG в локус *HTT* с помощью ПЦР;

(Б) Секвенограмма последовательности *HTT* в области гидролиза системой CRISPR/Cas9;

(В) Анализ синтеза мутантного хантингтина с помощью метода вестерн-блот.

С помощью анализа вестерн-блот с использованием антител против полиглутаминовых трактов (polyQ) был показан синтез мутантного хантингтина в клонах HEK293FT-F1 и HEK293FT-B5 (Рисунок 1В). Таким образом, с помощью вышеописанных методик было показано, что созданная система может быть использована для эффективного внесения удлиненного тракта повторов СAG в локус *HTT* и, соответственно, для создания клеточных моделей БХ.

## 2. Внесение мутации в ген *HTT* эмбриональных фибробластов человека и получение клонов ИПСК с целевой мутацией

### 2.1. Внесение удлиненного тракта повторов CAG в экзон 1 гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека

Эмбриональные фибробласты человека были трансфицированы аналогично клеткам линии HEK293FT. С помощью ПЦР было проанализировано 603 клон фибробластов, среди которых было выявлено 23 клон со встройками различной длины (Рисунок 2А). Эффективность гомологичной рекомбинации в локусе *HTT* в фибробластах составила около 4%, что согласуется с литературными данными (Lin et al., 2014).

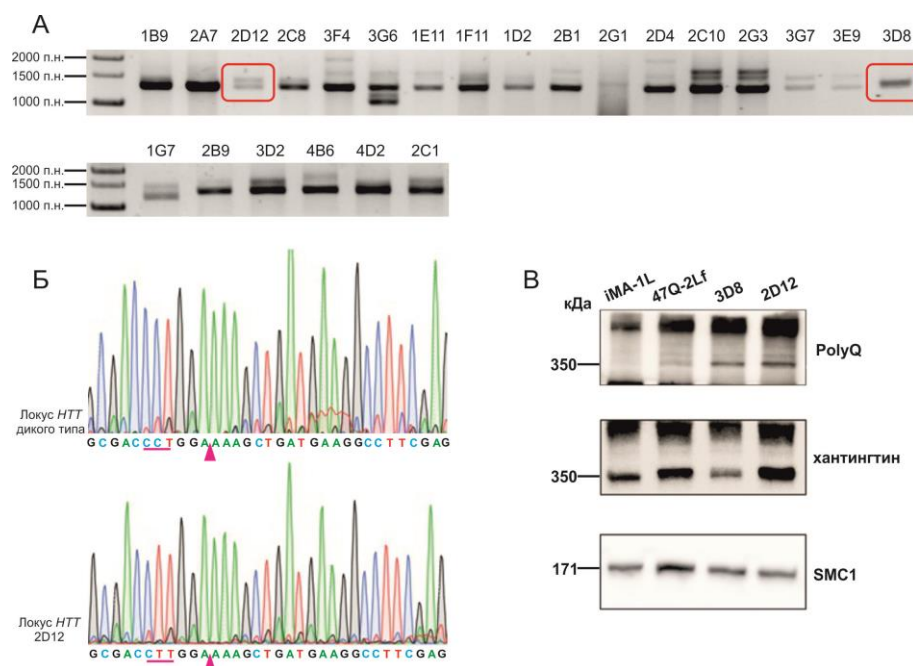


Рисунок 2. Внесение удлиненного тракта повторов CAG в 1 экзон гена *HTT* с помощью разработанной системы на основе гомологичной рекомбинации и CRISPR/Cas9.

(А) Анализ клонов клеток на наличие встройки удлиненного тракта повторов CAG в локус *HTT* с помощью ПЦР;

(Б) Секвенограмма последовательности *HTT* в области гидролиза системой CRISPR/Cas9;

(В) Анализ синтеза мутантного хантингтина с помощью метода вестерн-блот.

С помощью секвенирования по Сэнгеру области, содержащей сайт двунитевого разрыва в локусе *HTT*, двух клонов фибробластов – 2D12 и 3D8 – было показано, что у клона 2D12 с гетерозиготной встройкой удлиненного тракта повторов в аллеле с удлиненным трактом повторов присутствует целевая замена C>T и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК; в аллеле с нормальным числом повторов CAG в точке разрыва ДНК не было обнаружено модификаций, вызванных двунитевым разрывом (Рисунок 2Б). У клона 3D8 с гомозиготной встройкой удлиненного тракта повторов CAG в обоих аллелях так же присутствует целевая замена и отсутствуют нецелевые модификации в точке разрыва ДНК. На рисунке 2В приведен результат анализа вестерн-блот с использованием антител против полиглутаминового тракта (polyQ) и N-концевого фрагмента хантингтина (HTT), в результате которого был подтвержден синтез мутантного хантингтина в клонах с внесенной мутацией 2D12 и 3D8. В качестве



отрицательного контроля был использован белковый экстракт клеток линии iMA-1L, изогенного «здорового» контроля, а в качестве положительного контроля – белковый экстракт клеток линии 47Q-2Lf, пациент-специфичных ИПСК с 47 повторами CAG в 1 экзоне *HTT* (Grigor'eva et al., 2019).

## **2.2. Проверка нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в геноме клонов фибробластов с мутацией в гене *HTT***

При редактировании геномов важным шагом является оценка и проверка нецелевой активности созданных генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9.

Для поиска нецелевых сайтов выбранного спейсера в геноме человека был использован web-ресурс benchling.com, который позволяет найти наиболее возможные последовательности гидролиза в геноме исследуемого объекта.

В результате для анализа были выбраны первые 5 наиболее вероятных нецелевых сайта в геноме человека. Кроме того, все 5 сайтов находились в некодирующих участках генома. Дополнительно, был выбран также 27-й по счету нецелевой сайт, который находился в белок-кодирующем гене *HMGXB4*. Далее, последовательности ДНК, содержащие нецелевые сайты, off-target 1, off-target 2, off-target 3, off-target 4, off-target 5 и off-target 27, в геноме клеток MA№1, 2D12 и 3D8 были амплифицированы, и затем продукты ПЦР проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Так, было показано, что все последовательности сохранились интактными в каждой из исследованных линий клеток. Это указывало на специфическую активность выбранного спейсера системы CRISPR/Cas9 в локусе *HTT*.

## **2.3. Определение числа повторов CAG в первом экзоне гена *HTT* в клонах 2D12 и 3D8**

Для определения числа триплетов CAG в гене *HTT* был использован капиллярный электрофорез флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР. Было выявлено, что исходная линия фибробластов MA№1 содержит 22 и 20 повтора CAG в аллелях *HTT*. Клон 2D12 содержит 69 повторов CAG в одном аллеле и 20 повторов во втором аллеле, клон 3D8 – 40 и 53 повтора. Таким образом, были получены клоны клеток как с одним мутантным аллелем *HTT*, который является основным генотипом БХ, так и с двумя мутантными аллелями.

## **2.4. Получение ИПСК из эмбриональных фибробластов человека с удлинённым трактом CAG в гене *HTT***

Для получения ИПСК из клонов фибробластов 2D12 и 3D8 был использован ранее описанный протокол перепрограммирования с помощью эписомных векторов, которые не интегрируются в геном и обеспечивают временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности *OCT4*, *KLF4*, *L-MYC*, *SOX2* и *LIN28* (Okita et al., 2011).

Эписомы были доставлены в клетки с помощью электропорации. Примерно на 5-6 день культивирования после трансфекции наблюдалось изменение морфологии фибробластов – клетки становились округлыми и формировали небольшие скопления. На второй неделе культивирования становилось больше компактных групп клеток, которые формировали так называемые колонии первичных ИПСК. На 3 неделе крупные первичные колонии ИПСК с наиболее

ярко выраженной ЭСК-подобной морфологией механически переносили на слой ЭФМ. В результате перепрограммирования эмбриональных фибробластов человека 2D12 и 3D8 было получено 34 и 21 первичные линии соответственно. Полученные линии клеток интенсивно пролиферировали, колонии имели плоскую однослойную морфологию, и клетки экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу.

### 3. Характеристика ИПСК с мутацией в гене *HTT*

#### 3.1. Кариотипирование полученных ИПСК с мутацией в гене *HTT*

Для анализа кариотипа были выбраны 3 линии ИПСК 69Q-3Т, 69Q-9Т и 69Q-25L, полученные из клона 2D12, и 2 линии ИПСК 40/53Q-2L и 40/53Q-9L, полученные из клона 3D8. Линия 40/53Q-2L демонстрировала наиболее нестабильный кариотип – на 13 пассаже практически все клетки являлись полиплоидными. Поэтому эту линию ИПСК исключили из дальнейших экспериментов. Линии ИПСК 69Q-3Т (25 пассаж), 69Q-9Т (16 пассаж), 69Q-25L (24 пассаж), 40/53Q-9L (12 пассаж) демонстрировали кариотип, близкий к норме – 59%, 75%, 78% и 70% клеток соответственно имели кариотип 46, XY.

Таким образом, линии 69Q-3Т, 69Q-9Т, 69Q-25L и 40/53Q-9L могут быть в последующем охарактеризованы и использованы для моделирования БХ *in vitro*.

#### 1.2. Анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности и самообновления

С помощью количественной ПЦР в реальном времени в линиях ИПСК 69Q-3Т, 69Q-25L и 40/53Q-9L была проанализирована экспрессия 3 генов – *NANOG*, *OCT3/4* и *SOX2*. Так, было показано, что маркеры плюрипотентности экспрессируются на высоком уровне во всех линиях ИПСК, и не экспрессируются в исходной линии фибробластов МАН№1 (Рисунок 3А).

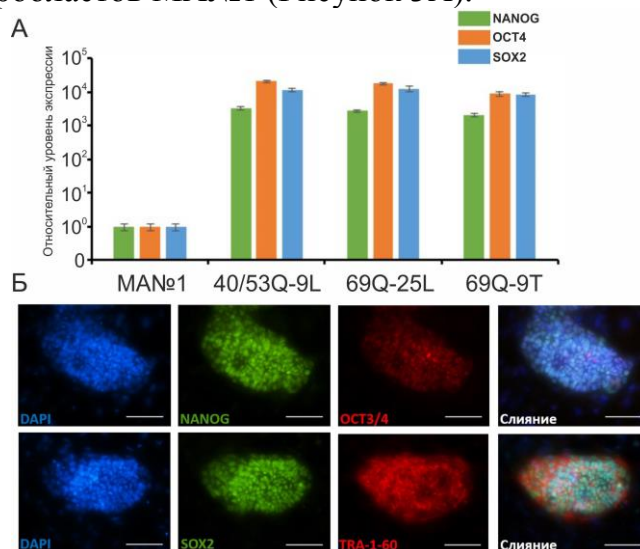


Рисунок 3. Анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании самообновления и плюрипотентности.

(А) Анализ экспрессии маркеров плюрипотентности с помощью количественной ПЦР в реальном времени (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего);

(Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК линии 69Q-9Т антителами против транскрипционных факторов OCT3/4, NANOG, SOX2, а также поверхностному антигену TRA-1-60. Шкала – 100 мкм.

С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что анализируемые линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, такие как поверхностный антиген TRA-1-60 и транскрипционные факторы NANOG, OCT4 и SOX2 (Рисунок 3Б). Таким образом, двумя разными методиками была подтверждена экспрессия основных генов плюрипотентных стволовых клеток человека в полученных линиях ИПСК.

### **3.3. Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro***

Необходимым этапом в характеристике ИПСК является подтверждение наличия свойства плюрипотентности, т.е. способности давать во время дифференцировки производные трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы.

Основной фактор роста фибробластов bFGF (FGF2) играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности, и удаление этого фактора из культуральной среды запускает спонтанную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека. При этом, если клетки культивируются в суспензии, наблюдается образование характерных структур – эмбриоидных телец, внутри которых происходят процессы интенсивной пролиферации и дифференцировки клеток, моделирующих процессы эмбрионального развития *in vivo*.

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания образцов после распластывания эмбриоидных телец, полученных при спонтанной дифференцировке всех четырех линий ИПСК, 69Q-3T, 69Q-9T, 69Q-25L и 40/53Q-9L, была показана экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков: эктодермы – основного белка цитоскелета нервных клеток NF200; мезодермы – одного из основных элементов сократительного аппарата гладкомышечных клеток  $\alpha$ SMA; энтодермы – ядерного фактора гепатоцитов 3B HNF3B. Таким образом, плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки в системе *in vitro*.

## **4. Направленная дифференцировка ИПСК с мутацией в гене *HTT* и изогенного контроля в срединные СШН и характеристика мутантного фенотипа полученных нейронов**

### **4.1. Дифференцировка ИПСК с мутацией в гене *HTT* и изогенного контроля в СШН**

Для направленной дифференцировки в СШН были отобраны 4 линии ИПСК – 69Q-3T, 69Q-9T, 69Q-25L и 40/53Q-9L, а также изогенный «здоровый» контроль – линия ИПСК iMA-1L, полученная при перепрограммировании фибробластов линии MA№1. Более того, для дифференцировки в качестве положительного контроля была использована линия ИПСК 47Q-2Lf, полученная при перепрограммировании мононуклеарных клеток пациента с 47 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT* (Grigor'eva et al., 2019).

Протокол дифференцировки в СШН включал три основных этапа– двойное SMAD-ингибирование, которое приводит к быстрой нейральной индукции и образованию клеток нейроэктодермы, созревание и получение интенсивно пролиферирующих клеток-предшественников СШН и, наконец, получение зрелых СШН. В процессе терминальной дифференцировки клетки постепенно прекращали пролиферировать, формировали длинные отростки и связи (Рисунок 4) Методом иммунофлуоресцентного окрашивания на 20 день терминальной дифференцировки

была показана экспрессия маркера зрелых нейронов MAP2, нейромедиатора СШН – ГАМК (GABA), а также синапсина 1 (SYN1), специфического фосфопротеина нейронов, участвующего в синаптогенезе и регуляции выхода нейромедиатора в синаптическую щель (Рисунок 4А).

С помощью количественной ПЦР в реальном времени был подтвержден высокий уровень экспрессии генов *MAP2*; *SYP*, кодирующего пресинаптический маркер синаптофизин; *GAD1*, кодирующего глутамат декарбоксилазу 1, которая синтезирует ГАМК (Рисунок 4Б).

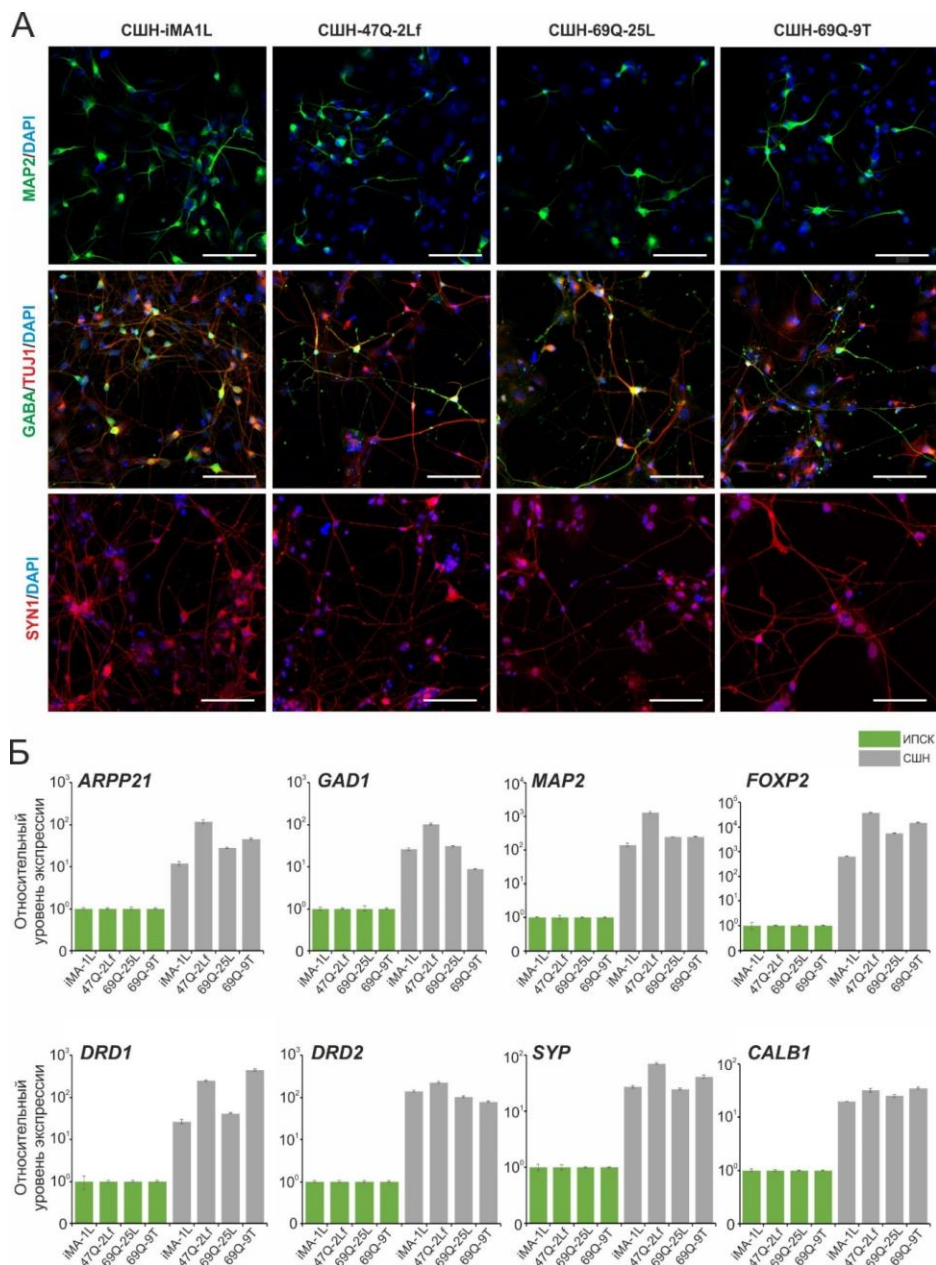


Рисунок 4. Терминальная дифференцировка в СШН.

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание нейронов на маркеры зрелых СШН, шкала – 100 мкм;

(Б) Анализ относительной экспрессии маркеров СШН с помощью количественной ПЦР в реальном времени; нормализация относительно уровня экспрессии в ИПСК (n=3, значения

для независимых биологических повторов показаны как среднее  $\pm$  стандартное отклонение среднего).

Также на стадии зрелых нейронов была показана экспрессия генов-маркеров нейронов стриатума *ARPP21* (играет центральную роль в интеграции ключевых сигналов нейромедиаторов на СШН посредством регуляции кальмодулин-зависимой киназы I и протеин-фосфатазы-2B), *CALB1* (кальбиндин, один из основных кальций-связывающих и буферных белков, играет важную роль в предотвращении гибели нейронов, а также в поддержании гомеостаза кальция), *FOXP2* (транскрипционный фактор, участвует в положительной регуляции дифференцировки СШН из клеток латерального ганглионарного бугорка, и в отрицательной регуляции формирования интернейронов из клеток дорсального медиального ганглионарного бугорка, через взаимодействие с сигнальным путем Hedgehog), *DRD1* и *DRD2*, которые являются главными типами дофаминовых рецепторов в стриатуме и, соответственно, разделяют популяцию СШН стриатума на две субпопуляции – D1- и D2-СШН (Рисунок 4Б).

#### **4.2. Анализ нейронов на наличие агрегатов мутантного хантингтина**

Ядерные и цитоплазматические включения мутантного хантингтина в нейронах являются отличительным признаком БХ (Arrasate & Finkbeiner, 2012). Однако, в результате иммунофлуоресцентного анализа с использованием антител против N-концевого фрагмента хантингтина и полиглутаминовых трактов (polyQ) не было выявлено хантингтин- или polyQ-позитивных агрегатов ни в клетках с внесенной мутацией в *HTT*, ни в пациент-специфичных нейронах. Цитоплазма и отростки всех исследованных нейронов равномерно окрашивались на хантингтин, а ядра – на полиглутаминовые повторы. Кроме того, были выявлены цитоплазматические polyQ-позитивные включения, не окрашенные антителами против хантингтина. Вероятно, это является результатом связывания анти-polyQ с другими белками, содержащими в норме 39 и более глутаминовых остатков. К таким белкам относятся атрофин-1, атаксин-1 и атаксин-3, PPP2R2B и TATA-связывающий белок (Adegbuyiro et al., 2017).

Полученные результаты в целом соответствует данным многих исследовательских групп, изучавшим нейроны, дифференцированные из пациент-специфичных ИПСК ( The HD iPSC Consortium, 2012; An et al., 2012; Jeon et al., 2012; Nekrasov et al., 2016). Вероятно, поздняя манифестация БХ делает возраст особенно важным фактором, который должен быть соответствующим образом отражен в модели.

Одной из возможных причин довольно слабого проявления патологического фенотипа в нейронах, полученных из ИПСК, также может быть процесс перепрограммирования, когда клетки теряют «возрастные» эпигенетические модификации и снова приобретают эмбриональный фенотип. В недавних работах было показано, что возраст-зависимый фенотип БХ лучше воспроизводится стриарными СШН, полученными при непосредственной трансдифференцировке пациент-специфичных фибробластов (Victor et al., 2014, 2018).

#### **4.3. Влияние мутации на ультраструктурную организацию нейронов**

Согласно электронномикроскопическому исследованию, проведенному Сульдиной Л.А., число шипиков на дендритах мутантных СШН как пациент-специфичных, так и линий с внесенной мутацией в ген *HTT*, увеличено по

сравнению с контролем, появляются необычные шипики – длинные и тонкие (Рисунок 5Г, Е). Также в культуре мутантных нейронов было выявлено большое число дефектных синапсов: пресинаптические окончания со светлым пустым пространством и с атипично расположенными синаптическими пузырьками разного размера (Рисунок 5Ж). Более того, в нейронах СШН-47Q-2Lf и СШН-69Q-25L были обнаружены митохондрии с измененной морфологией, встречались необычно крупные и разветвленные митохондрии (Рисунок 5Д, З).

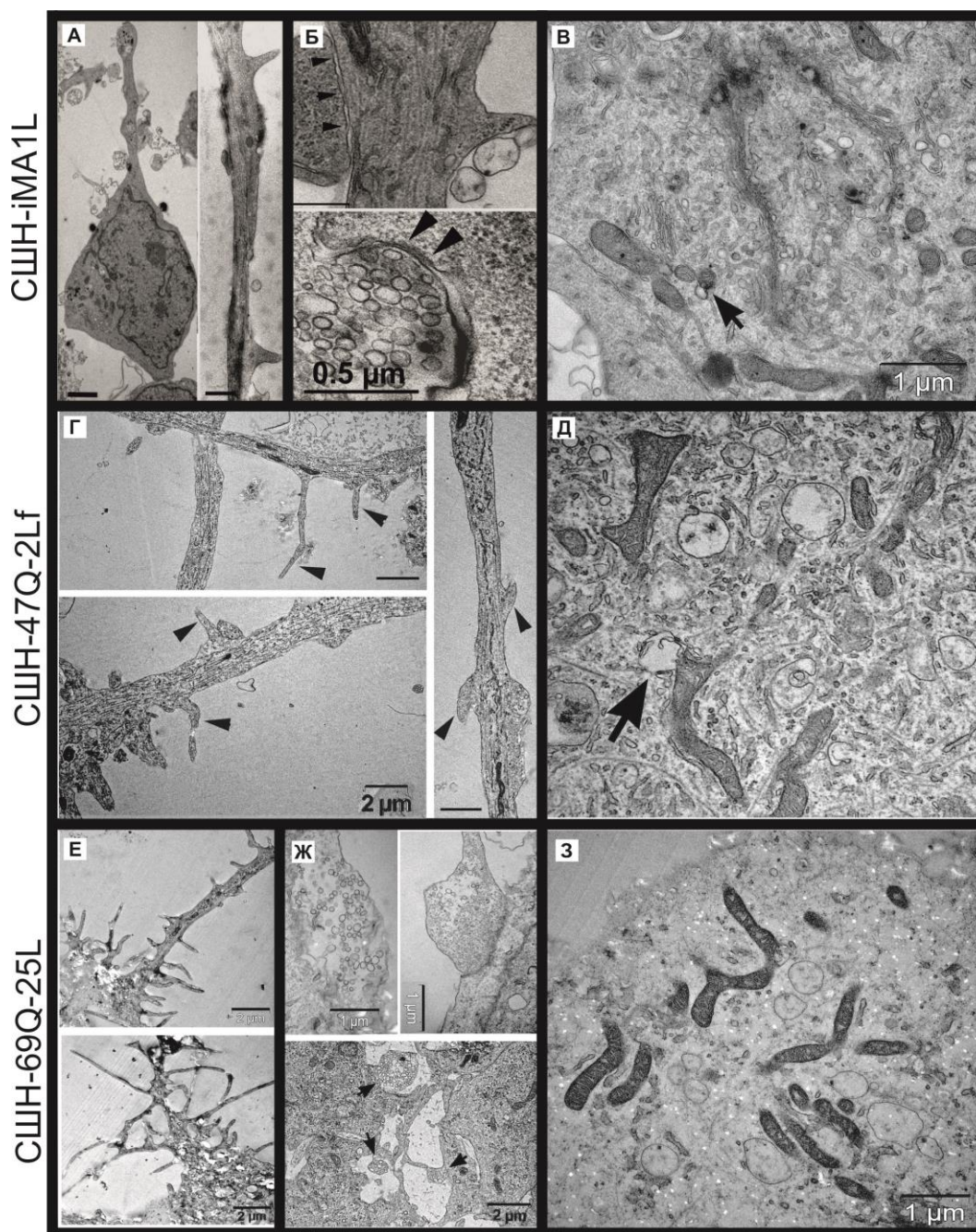


Рисунок 5. Ультраструктурные нарушения в мутантных СШН.

(А, Г, Е) Морфология и шипики. Стрелками обозначены шипики;

(Б, Ж) Синапсы. Стрелками обозначены синапсы;

(В, Д, З) Митохондрии. Стрелками обозначена митофагия.

Электронномикроскопические фотографии любезно предоставлены Сульдиной Л.А.

Выявленные качественные патологические изменения в целом воспроизводят мутантный фенотип нейронов при БХ. Таким образом, мутация, внесенная в геном клеток с помощью системы CRISPR/Cas9 и вызывающая БХ, действительно оказала негативный эффект на клеточные процессы и, соответственно, на ультраструктурную организацию нейронов в период до начала формирования белковых агрегатов.

#### 4.4. Сравнение эффективности формирования нейральных розеток

Исследования *in vitro* показали, что у пациент-специфичных ИПСК нарушена способность при дифференцировке формировать нейральные розетки – совокупность радиально расположенных столбчатых клеток, которые экспрессируют многие белки-маркеры нейроэпителиальных клеток нервной трубки, и являются источниками развития нейральных предшественников в культурах дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток (Jeon et al., 2012; Xu et al., 2017). В соответствии с этими исследованиями была проведена дифференцировка ИПСК линий iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T в нейральные розетки через этап формирования эмбрионидных телец и культивирования в среде для нейральной индукции, содержащей такие факторы как N2 и bFGF.

После распластывания эмбрионидных телец наблюдалось формирование заметно менее развитых и небольших по размеру нейральных розеток как в пациент-специфичной линии 47Q-2LF, так и в линиях 69Q-25L и 69Q-9T, в то время как клетки изогенной контрольной линии iMA-1L формировали крупные и хорошо развитые нейральные розетки (Рисунок 6). Вероятно, это нарушение действительно является следствием мутации и не связано с различиями в генетическом фоне.

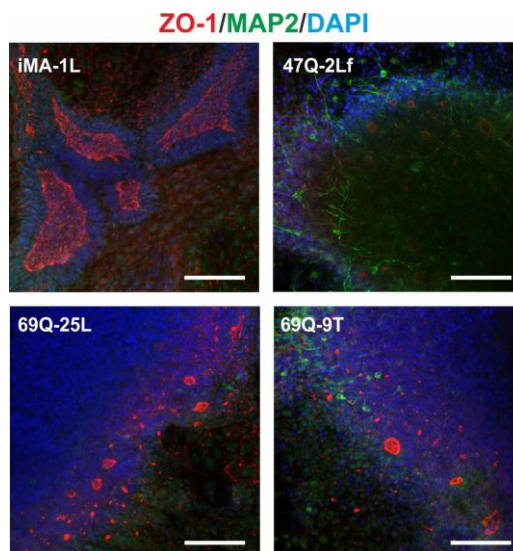


Рисунок 6. Оценка формирования нейральных розеток после нейральной индукции iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T. Окрашивание на MAP2 (зеленый), маркер нейронов, и ZO-1 (красный), маркер люминальных розеток. Результаты были воспроизведены в трех независимых экспериментах. Шкала – 100 мкм.

Таким образом, нарушение формирования нейральных розеток, которые воспроизводят нейрогенез *in vitro*, при дифференцировке как пациент-специфичных ИПСК, так и ИПСК с внесенной мутацией, является подтверждением

приведенных выше данных о раннем влиянии мутантного хантингтина на развитие нервной системы.

#### 4.5. Дифференциальная чувствительность клеток-предшественников СШН к отсутствию факторов роста

Каспаза-3 является ключевым медиатором апоптоза нейронов при развитии множества нейродегенеративных заболеваний (Khan et al., 2015). Более того, у пациентов с БХ повышается активность каспазы-3 в лимфообластах (Maglione et al., 2006), а также при стрессовых воздействиях – инкубирование лимфобластов с цианидом, культивирование нейтральных стволовых клеток в среде без факторов роста (Squitieri et al., 2011; An et al., 2012; Xiaohong Xu et al., 2017).

Предшественники СШН, полученные при дифференцировке ИПСК линий iMA-1L, 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T, инкубировали в течение 24 ч в среде без фактора роста BDNF, затем оценивали активность каспазы-3 с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания. Действительно, было обнаружено значительное увеличение активности каспазы-3 в мутантных предшественниках 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T при депривации фактора роста по сравнению с контролем (Рисунок 7). Напротив, мутантные предшественники не показали значимых различий увеличения активности каспазы-3 при сравнении друг с другом. Стоит отметить, что во всех линиях мутантных предшественников СШН, а также в контрольной линии клеток, наблюдалось значимое увеличение числа каспаза-3-позитивных клеток при отмене фактора роста BDNF.

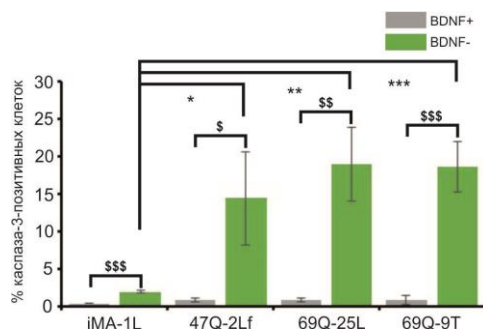


Рисунок 7. Повышенная чувствительность мутантных предшественников СШН к удалению факторов роста. Гибель клеток оценивали с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания антителами против активированной каспазы-3 после удаления фактора роста BDNF (n=3, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 – сравнение между линиями при отмене BDNF, \$p<0,05, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 – сравнение одной линии до и после удаления BDNF).

Наблюдаемое повышение активности каспазы-3 в предшественниках СШН при депривации факторов роста воспроизвело хорошо охарактеризованный фенотип заболевания, наблюдаемый на различных моделях БХ, и внесение мутации в ген *HTT* способствовало проявлению этого фенотипа.

#### 4.6. Уменьшение уровня N-кадгерина в предшественниках СШН с внесенной мутацией в ген *HTT*

Известно, что нарушение энергетического метаболизма в нейрональных клетках при БХ влияет на уровень N-кадгерина. Предшественники СШН с



внесенной мутацией в ген *HTT* демонстрировали достоверно более низкий уровень N-кадгерина по сравнению с изогенным контролем (Рисунок 8). Однако, уровень N-кадгерина в предшественниках СШН, полученных при дифференцировке пациент-специфичной линии ИПСК 47Q-2Lf был значительно выше, чем в неизогенном для них контроле – линии iMA-1L (Рисунок 8А). Такой результат возможно связан с тем, что в гене *HTT* пациент-специфичной линии всего 47 повторов САG, тогда как сниженный уровень N-кадгерина наблюдали только в клетках со значительно большим числом повторов ( $\geq 72$  САG) (Reis et al., 2011; An et al., 2012). Еще одной причиной может быть исходно повышенный уровень N-кадгерина специфично в данной линии. Поэтому для точного выявления уменьшения уровня N-кадгерина необходимо исследовать несколько пациент-специфичных линий, чтобы оценить средний уровень этого белка в разных мутантных клетках.

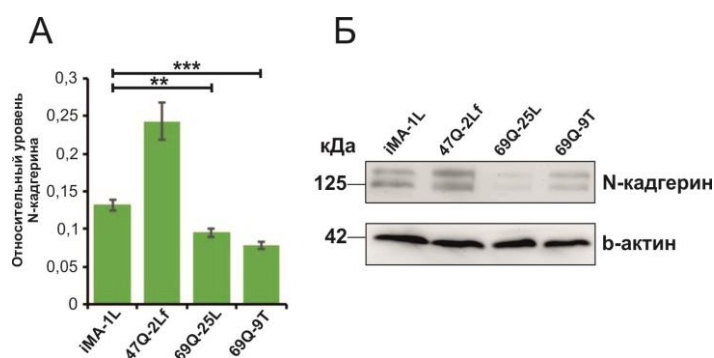


Рисунок 8. Уровень N-кадгерина в предшественниках СШН.

(А) Полуколичественный анализ уровня N-кадгерина с помощью метода вестерн-блот ( $n=3$ , значения для независимых биологических повторов показаны как среднее  $\pm$  стандартное отклонение среднего, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  – сравнение между линиями);

(Б) Анализ вестерн-блот экспрессии N-кадгерина в предшественниках СШН.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была создана и использована система на основе CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации для внесения мутации, вызывающей БХ, а именно – удлиненного тракта тринуклеотидных повторов САG в первый экзон гена *HTT*. В результате использования нами разработанной системы было получено двадцать три клональные линии эмбриональных фибробластов человека с удлиненным трактом САG-повторов в целевом локусе. В двух исследованных линиях была показана экспрессия мутантного хантингтина на уровне белка. Далее, эти две линии, одна из которых содержала гетерозиготную встройку повторов, а другая – гомозиготную встройку, были перепрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью неинтегрирующихся в геном эписомных векторов, обеспечивавших временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности. Плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью общепринятых стандартных тестов. Для направленной дифференцировки ИПСК в зрелые СШН была использована комбинация нескольких протоколов с модификациями.

Мутантные ИПСК демонстрировали формирование небольших и слабо развитых нейральных розеток при спонтанной нейральной дифференцировке, в то время как клетки изогенного контроля формировали характерные розетки.

Предшественники СШН с мутацией в *HTT* имели значительно более низкую выживаемость при удалении BDNF и низкий уровень N-кадгерина по сравнению с изогенным контролем. Более того, нейроны с мутацией демонстрировали мутантный фенотип на ультраструктурном уровне.

Полученная изогенная модельная система может служить основой для изучения молекулярно-генетических основ БХ и скрининга потенциальных лекарств-кандидатов без учета влияния генетического фона. Кроме того, тот факт, что при дифференцировке ИПСК формируются нейроны с эмбриональным фенотипом, делает возможным изучение ранних патологических изменений. Это в свою очередь может позволить проводить превентивную терапию заболевания и, тем самым, не только отсрочить, но также, возможно, вообще избежать появления симптомов болезни.

## ВЫВОДЫ

1. Создана система для проведения гомологичной рекомбинации в экзоне 1 гена *HTT*, состоящая из генетической конструкции, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и донорные генетические конструкции, содержащие 69 и 148 триплетов CAG.
2. Эффективность работы созданной системы проверена на клетках линии НЕК293FT, в результате чего получено два клона, НЕК293-F1 (148Q/148Q) и НЕК293-B5 (69Q/ $\Delta$ *HTT*), с гомо- и гетерозиготнойстройкой удлиненного тракта триплетов CAG, и показана экспрессия мутантного хантингтина с помощью анализа вестерн-блот.
3. С помощью созданной системы получено 23 клона эмбриональных фибробластов человека с мутацией в гене *HTT*.
4. Клоны фибробластов 2D12 (69Q/20Q) и 3D8 (53Q/40Q) были перепрограммированы к плюрипотентному состоянию с использованием эписомных векторов, в результате чего было получено 11 и 2 линии ИПСК соответственно.
5. Показано, что полученные линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, при спонтанной дифференцировке в эмбриональных тельцах образуют типы клеток трех примитивных зародышевых листков и имеют кариотип близкий к норме.
6. В результате направленной дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *HTT* получены нейроны, экспрессирующие гены-маркеры СШН стриатума, такие как *GAD1*, *ARPP21*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и *CALB1*.
7. Мутантные клетки демонстрировали патологический фенотип, наблюдающийся при БХ: нарушенное формирование нейральных розеток, высокая чувствительность к удалению трофических факторов и сниженный уровень N-кадгерина на стадии предшественников СШН, ультраструктурные нарушения терминально дифференцированных СШН.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Grigor'eva E.V.\*, **Malankhanova T.B.\***, Surumbayeva A., Minina J.M., Morozov V.V., Abramychева N.Y., Illarioshkin S.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. Generation of induced pluripotent stem cell line, ICGi007-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with Huntington's disease // *Stem Cell Res.* 2019. Vol. 34. P. 101382. \* равный вклад авторов.
2. Morozova K.N., Suldina L.A., **Malankhanova T.B.**, Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // *PLoS One.* 2018. Vol. 13(10). P. e0204735.
3. Шарипова Д.В., **Маланханова Т.Б.**, Малахова А.А. Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии HEK293 // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2017. Т. 21(7). С. 856-861.
4. **Malankhanova T.B.**, Malakhova A.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Modern Genome Editing Technologies in Huntington's Disease Research // *J Huntingtons Dis.* 2017. V. 6(1). P. 19-31.
5. Малахова А.А., Сорокин М.А., Сорокина А.Е., **Маланханова Т.Б.**, Мазурок Н.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Использование методов редактирования генома для создания изогенных клеточных линий, моделирующих болезнь Хантингтона *in vitro* // *Гены и клетки.* 2016. Т. 11. № 2. С. 106-113.

