

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации МАЛАНХАНОВОЙ Т. Б.

**«СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертационная работа, выполненная МАЛАНХАНОВОЙ Т.Б., посвящена созданию и получению характеристик модельной системы болезни Хантингтона на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Согласно современным представлениям болезнь Хантингтона (БХ) – это аутосомно-доминантное генетическое заболевание нервной системы, характеризующееся постепенным началом обычно в возрасте 30—50 лет и сочетанием прогрессирующего хореического гиперкинеза и психических расстройств. Частота встречаемости заболевания среди населения с европейскими корнями составляет примерно 3-7:100000, и 1:1000000 среди остальных рас. Заболевание вызывается увеличением числа тринуклеотидных триплетов CAG в первом экзоне гена Htt, который кодирует 350-kDa белок хантингтин с неизвестной функцией. В гене дикого типа (не мутантного) у разных людей присутствует разное количество CAG-повторов, однако, когда число повторов превышает 36, развивается болезнь. 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. Нейроморфологическая картина характеризуется атрофией стриатума, а на поздней стадии также атрофией коры головного мозга. Потеря СШН приводит к двигательным дисфункциям, когнитивным расстройствам и, в конечном счете, смерти пациента. С момента появления первых симптомов продолжительность жизни больных БХ составляет около 15—20 лет. Смерть обычно происходит не из-за болезни Хантингтона, а из-за сопутствующих ей осложнений, включая пневмонию, заболевания сердца и травмы. Частой причиной смерти является суицид. Болезнь Хантингтона неизлечима, к сожалению в настоящее время существует только симптоматическое лечение, способное облегчить некоторые симптомы. Во многом эта ситуация объясняется несовершенством существующих клеточных моделей для адекватного воспроизведения патологических процессов и изучения молекулярных аспектов развития данного заболевания. Модели на основе культивируемых клеток человека являются наиболее перспективным подходом для таких исследований. СШН, полученные при направленной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека, дают наиболее точную картину патологических процессов, происходящих при БХ. Получение пациент-специфических клеточных моделей стало возможным благодаря технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которая открыла новые возможности моделирования целого ряда нейродегенеративных заболеваний. Одной из проблем при создании таких моделей является наличие однонуклеотидных полиморфизмов в геноме клеток от разных пациентов, что требует



наличия большой выборки клеток от пациентов и «здоровых» доноров, значительно удорожая и усложняя такие исследования.

Одним из решений данной проблемы могут служить изогенные линии клеток, способные обеспечивать адекватный «отрицательный» контроль, поскольку имеют идентичный генетический фон и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием мутации, вызывающей конкретное заболевание. Изогенные пары клеточных линий можно получить либо внося мутацию, вызывающую заболевание, в «здоровые» клетки, либо исправляя мутацию в пациент-специфичных клетках от больных данным заболеванием людей с помощью такого элегантного инструмента для редактирования генов как CRISPR/Cas9. Такие созданные изогенные клеточные модели могут быть релевантной и перспективной платформой для тестирования лекарственных препаратов, а также изучения молекулярных основ развития БХ.

Таким образом, поставленная в рецензируемой диссертационной работе цель создать и охарактеризовать модельную систему болезни Хантингтона на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека является актуальной и имеет важное научно-практическое значение.

Для решения поставленных задач в работе использован набор современных и адекватных методов исследования в модельных системах *in vivo* и *in vitro*: репрограммирование фибробластов к плюрипотентному состоянию, спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*, дифференцировку ИПСК в нейральные розетки, направленную дифференцировку ИПСК в СШН, кариотипический анализ, спектр современных гистохимических, иммуно-гистохимических и молекулярно-биологических (выделение РНК, синтез кДНК методом обратной транскрипции, количественная ПЦР в реальном времени, Вестерн-блот и др.) методов и др. Для обработки полученных результатов были использованы адекватные методы математической статистики.

Автором был проведен выбор последовательности протоспейсера для действия CRISPR/Cas9 в локусе НТТ и внесение синонимичной замены в последовательность донорного вектора. В частности, был выбран протоспейсер в 5'-плече гомологии локуса НТТ на расстоянии 20 п.н. от тракта повторов СAG. С помощью методов молекулярного клонирования была внесена синонимичная замена С>Т (в некодирующей цепи – G>A) в 5'-плече гомологии донорных плазмид, содержащих 69 и 148 повторов СAG (плазмида Donor-НТТ-69Q и Donor-НТТ-148Q). Эта замена изменила каноническую последовательность РAМ 5'-AGG-3' на неканоническую 5'-AAG-3', которая значительно снижает нуклеазную активность Cas9.

В работе в экспериментальной системе на клетках линии НЕК293FT автором была проведена проверка системы для внесения мутации в ген НТТ. Для этого клетки линии НЕК293FT трансфицировали плазмидами Donor-НТТ-69Q/pX458-НТТ и Donor-НТТ-148Q/pX458-НТТ. ПЦР анализ 136 клонов показал, что 2 клон, НЕК293FT-F1 и НЕК293FT-B5, имели продукты с большим молекулярным весом, в отличие от продукта ПЦР с участка НТТ дикого типа. Результаты секвенирования по Сэнгеру показали наличие однонуклеотидной замены, которая предотвратила повторный гидролиз протоспейсера и, соответственно, возникновение нецелевых модификаций. Синтез мутантного хатингтина в клонах НЕК293FT-F1 и НЕК293FT-B5 был подтвержден методом вестерн-блот. Таким образом было показана эффективность внесения удлиненного тракта повторов



CAG в локус НТТ с помощью созданной автором системы, что указывает на ее применимость для создания клеточных моделей БХ.

Разработанная автором система была использована для внесения удлиненного тракта повторов CAG в экзон 1 гена НТТ эмбриональных фибробластов человека. Используя ту же стратегию и последовательность действий был подтвержден синтез мутантного хантингина с внесенной мутацией в клонах 2D12 и 3D8 эмбриональных фибробластов человека. Оценка и проверка нецелевой активности созданных генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9 в геноме клонов фибробластов с мутацией в гене НТТ показала, что все последовательности сохранились интактными в каждой из исследованных линий клеток. Это указывало на специфическую активность выбранного спейсера системы CRISPR/Cas9 в локусе НТТ. Методом капиллярного электрофореза флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР было показано, что полученные клоны представлены как клетками с одним мутантным аллелем (клон 3D8 – 40 и 53 CAG повтора), который является основным генотипом БХ, так и с двумя мутантными аллелями (клон 2D12 - 69 повторов CAG в одном аллеле и 20 повторов во втором аллеле) НТТ.

С помощью перепрограммирования эмбриональных фибробластов человека 2D12 и 3D8 с помощью эписомных векторов, которые не интегрируются в геном и обеспечивают временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2 и LIN28, автором было получено 34 и 21 первичные линии соответственно. Полученные линии клеток интенсивно пролиферировали, колонии имели плоскую однослойную морфологию, и клетки экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу. Кариотипирование полученных ИПСК с мутацией в гене НТТ показало, что линии ИПСК полученные из клона 2D12 (69Q-3T (25 пассаж), 69Q-9T (16 пассаж), 69Q-25L (24 пассаж)) и 40/53Q-9L (12 пассаж), полученная из клона 3D8, демонстрировали кариотип, близкий к норме, что позволило использовать их для характеристики и последующего моделирования БХ *in vitro*.

С помощью количественной ПЦР в реальном времени и иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) автором было показано, что маркеры плюрипотентности (поверхностный антиген TRA-1-60 и 3 гена кодирующих транскрипционные факторы NANOG, OCT3/4 и SOX2) экспрессируются на высоком уровне во всех линиях ИПСК, и не экспрессируются в исходной линии фибробластов МА№1. Плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки в системе *in vitro* с помощью удаления основного фактора роста фибробластов bFGF (FGF2) из культуральной среды, что запускает спонтанную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека. Так, ИФА образцов после распластывания эмбрионидных теллец, полученных при спонтанной дифференцировке всех четырех линий ИПСК, выявил экспрессию характерных маркеров производных трех зародышевых листков: NF200 – эктодермы; α SMA- мезодермы; ядерного фактора гепатоцитов 3B HNF3B- энтодермы.

Отобранные 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 МА№1 были подвержены направленной дифференцировке в СШН. ИФА и количественной ПЦР в реальном времени на 20 день терминальной дифференцировки подтвердили экспрессию MAP2 (маркера зрелых нейронов); ГАМК (GABA) - СШН-специфичного нейромедиатора; синапсина 1 (SYN1), специфического фосфопротеина нейронов, а так же высокий уровень экспрессии генов



MAP2; SYP, кодирующего пресинаптический маркер синаптофизин; GAD1, кодирующего глутамат декарбоксилазу 1, которая синтезирует ГАМК. Кроме того, на стадии зрелых нейронов была показана экспрессия ряда характерных генов-маркеров нейронов стриатума: ARPP21; CALB1; транскрипционного фактора FOXP2 и двух ключевых допаминовых рецепторов стриатума - DRD1 и DRD2.

Интересно, что не смотря на наличие патологической сигнатуры из избыточного количества полиглутаминовых трактов (polyQ), ни в клетках с внесенной мутацией в НТТ, ни в пациент-специфичных нейронах, автором не было обнаружено характерных для БХ ядерных и цитоплазматических включений (агрегатов) мутантного хантингина как видно по результатам ИФА. К сожалению автор не провел более детальный анализ причины этого феномена, который так же был отмечен в ряде работ других авторов, что, конечно, не умаляет важности проведенной диссертантом работы. Хочется высказать пожелание, чтобы работы в данном направлении были продолжены диссертантом особенно с точки зрения отработки условий, способствующих воспроизведению БХ фенотипа в клеточных линиях, полученных автором, с тем, чтобы созданные на их основе модели можно было использовать для более глубокого понимания механизма возникновения БХ фенотипа и поиска фармакологических модуляторов препятствующих его развитию.

Другим не менее интересным и важным с точки зрения понимание патогенеза БХ являются выявленные с помощью ТЭМ качественные патологические изменения в дендритах мутантных СШН как пациент-специфичных, так и линий с внесенной мутацией в ген НТТ. Морфологически аномалии шипиков и признаки дефектных синапсов, необычно крупные и разветвленные митохондрии – скорее всего свидетельствуют о том, что мутация, внесенная в геном клеток с помощью системы CRISPR/Cas9 и вызывающая БХ, действительно оказала негативный эффект на ультраструктурную организацию нейронов в период до начала формирования белковых агрегатов. Кроме того, методом ИФА автором было показано нарушение способности формировать нейральные розетки, которые воспроизводят нейрогенез *in vitro* при дифференцировке пациент-специфичной линии 47Q-2LF, так и в линиях 69Q-25L и 69Q-9T по сравнению с контрольной линией iMA-1L. Эти нарушения формирования нейральных розеток при дифференцировке как пациент-специфичных ИПСК, так и ИПСК с внесенной мутацией может указывать на раннее влияние мутантного хантингина на развитие нервной системы, показанное в ряде работ других авторов. Другим важным с механистической точки зрения является обнаруженная автором нарушенная устойчивость предшественников СШН, полученных при дифференцировке ИПСК линий 47Q-2LF, 69Q-25L и 69Q-9T, к стрессу, вызванному недостатком или отсутствием необходимых нейротрофических факторов, в частности BDNF. Повышенная по сравнению с контролем (iMA-1L) активность капазы-3 в предшественниках СШН с мутацией в гене НТТ при депривации BDNF воспроизвело хорошо охарактеризованный фенотип заболевания, наблюдаемый на различных моделях БХ. Продемонстрированный автором достоверно более низкий уровень N-кадгерина в предшественниках СШН с внесенной мутацией в ген НТТ по сравнению с изогенным контролем еще раз подтверждает возможное нарушение энергетического метаболизма, о котором свидетельствует наличие митохондриальных аномалий, обнаруженных автором при анализе с помощью ТЭМ.



Резюмируя, автором была создана и использована система на основе CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации для внесения мутации, вызывающей БХ, а именно – удлиненного тракта тринуклеотидных повторов СAG в первый экзон гена НТТ. На основе разработанной автором системы было получено двадцать три клональные линии эмбриональных фибробластов человека с удлиненным трактом СAG-повторов в целевом локусе. В двух исследованных линиях была показана экспрессия мутантного хантингина на уровне белка. 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 и полученные из них предшественники СШН с мутацией в НТТ не смотря на отсутствие внутриклеточных агрегатов хантингина, демонстрировали формирование ряда функциональных (спонтанная нейральная дифференцировка, выживаемость при истощении BDNF, метаболизм-ассоциированная экспрессия белка N-кадгерина) и морфологических (структурная синапто- и митопатии) дефектов, характерных для фенотипа БХ.

Хочется подчеркнуть, что данная работа имеет существенное теоретическое и научно-прикладное значение. В частности, исключительно важно, что представленные в данной работе данные еще раз подтверждают высказанную ранее гипотезу, что формирование агрегатов белков при различных нейродегенеративных заболеваниях, относящихся к так называемой группе “Protein Misfolding Diseases”, является эпи-феноменом, тогда как наиболее ранние точки начала развития патологических процессов лежат чаще всего в нарушениях клеточного метаболизма (митохондрий в частности), процессов передачи сигнала в синапсах и нейрогенеза, которые и являются основными драйверами запускающими самоподдерживающийся замкнутый порочный круг развития патологии на ранней стадии, а накопленные с возрастом продукты метаболических нарушений и синаптической дегенерации находят свое проявление в виде различных форм агрегированных неправильно упакованных белков, таких как хантингин в нашем случае. Разработанная автором изогенная модельная система может служить основой для изучения молекулярно-генетических основ БХ и скрининга потенциальных лекарств-кандидатов без учета влияния генетического фона. Наличие эмбрионального фенотипа у нейронов, сформированных в результате дифференцировки ИПСК, делает возможным изучение и подбор адекватной фармакологической коррекции наступления и развития ранних патологических изменений, т.е. разработку методов и средств для так называемой терапии, меняющей течение заболевания (или “disease-modifying therapy”), которая полностью отсутствует в настоящее время для страдающих БХ пациентов.

Диссертационная работа Маланхановой Т.Б. является самостоятельным, законченным исследованием, обладающим несомненной научной и практической значимостью.

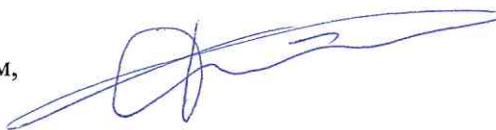


Автор выполнил поставленные задачи, на основании анализа полученных результатов обоснованно сформулировал выводы и практические рекомендации.

По материалам диссертации опубликовано 5 работ в рецензируемых научных журналах из списка ВАК при Министерстве образования и науки РФ, индексируемых РИНЦ и Web of Science.

На основании материала, изложенного в автореферате диссертации Маланхановой Туяны Баировны «Создание и характеристика клеточной модели Болезни Хантингтона» можно заключить, что по актуальности поставленных задач и способам их решения, новизне, уровню исследований, достоверности результатов, теоретической и практической значимости работа отвечает всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Директор по научной работе Центра Живых Систем,
Зав. Лаборатории разработки инновационных
лекарственных средств, МФТИ.
кандидат биологических наук



Сергей Викторович Леонов

Адрес: 141700, г.Долгопрудный, Московской области, Институтский переулок д.9, стр.7
Тел. оффис: +7 (495) 408 42 00 ; моб.: +7 (915) 055-5643 эл. почта: leonov.sv@mipt.ru

Подпись Леонова Сергея Викторовича заверяю

Дата:

30.01.2020г.



Подпись руки

С. В. Леонова

ЗАВЕРЯЮ:

СЛЕДУЮЩАЯ КАНЦЕЛЯРИЕЙ
АДМИНИСТРАТИВНОГО ОТДЕЛА
М. А. Гусева

