

ВАЛЕТДИНОВА
Камила Робертовна

**ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ
АТРОФИИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

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: **Гуляева Людмила Федоровна**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярных
механизмов канцерогенеза Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Научно-исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики», г.
Новосибирск

Захарова Мария Николаевна
доктор медицинских наук, руководитель б
неврологического отделения Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Научный центр неврологии», г.
Москва

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук», г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 201_ 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.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Спинальная мышечная атрофия (СМА) объединяет группу наследственных заболеваний, отличительной особенностью которых является прогрессирующая дегенерация периферических моторных нейронов, что приводит к развитию симметричного вялого паралича поперечно-полосатой мускулатуры. Наиболее часто встречающейся формой СМА является проксимальная СМА I-IV типов (Munsat, Davies, 1992). При этом наиболее тяжелыми являются I и II тип, развивающиеся в раннем детском возрасте (Finkel et al., 2014). В среднем 1 из 6000-10000 детей рождается со СМА, при этом около 50% больных детей не доживают до 2 лет (Prior et al., 2010). Генетической причиной этого заболевания являются мутации в гене *SMN1* (survival of motor neuron) (Lefebvre et al., 1995). Причем к развитию патологии приводят только те мутации (преимущественно делеции), которые затрагивают 7 экзон данного гена. Основным модифицирующим фактором при СМА, оказывающим влияние на степень проявления и скорость развития симптомов, является количество копий гена *SMN2* (Monani et al., 1999). Чем больше копий *SMN2*, тем больше присутствует полноразмерного белка SMN и тем мягче течение заболевания. Эффекты мутаций в гене *SMN1* до конца не изучены, что затрудняет поиск оптимального метода лечения. Поэтому актуальной задачей является получение адекватной модельной системы СМА.

Классические модельные объекты биологии – нематода, дрозофила, *Danio rerio*, мышшь широко используются для изучения механизмов этиопатогенеза СМА, тестирования лекарственных соединений и разработки подходов к лечению данного заболевания (Valetdinova et al., 2015). Однако на генетическом и фенотипическом уровне подобные модели не соответствуют тому, что наблюдается при СМА у человека. Это обусловлено тем, что перечисленные организмы отличаются по своей генетике, физиологии, морфологии от человека и клеток его тела. Одним из ведущих отличий является то, что в геноме этих модельных объектов присутствует только один ген *Smn*, эквивалентный гену *SMN1* человека. Данный факт требует усложнения естественной системы модельного организма – внедрения дополнительных копий трансгена *SMN2* человека (Edens et al., 2015).

Поэтому в настоящее время активно развивается направление, основанное на получении клеточных моделей СМА с помощью дифференцированных производных пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека (Ebert et al., 2009, Sareen et al., 2012). Моторные нейроны, дифференцированные из ИПСК и воспроизводящие фенотип данного заболевания, могут быть использованы в исследовании патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели двигательных нейронов, для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики лечения не только СМА, но и повреждений спинного мозга (Lunn et al., 2011, Corti et al., 2012, Amemori et al., 2013). В перспективе данная технология может стать основой для заместительной клеточной терапии поврежденных нервных клеток, а также компонентов микроокружения, вырабатывающих нейротрофические факторы и перерабатывающих токсические метаболиты. Однако для этого необходимо решить ряд вопросов, касающихся эффективной направленной дифференцировки ИПСК в моторные нейроны определенного типа, масштабирования экспериментов для проведения фармакологических исследований, разработки высокоэффективных

и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, а также методов трансплантации нервных клеток и/или их предшественников, способных восполнить функции погибших клеток спинного мозга. И первым этапом на пути к решению указанных проблем является создание новых клеточных моделей СМА, охватывающих весь спектр патологических проявлений данного заболевания на молекулярном и клеточном уровне.

Цель работы - получить и охарактеризовать модельную систему спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Задачи:

1. Репрограммировать фибробласты от пациентов со спинальной мышечной атрофией I, II типа и здорового человека к плюрипотентному состоянию.
2. Охарактеризовать полученные линии с использованием стандартных тестов на плюрипотентность.
3. Провести направленную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в моторные нейроны и охарактеризовать полученные клетки.

Научная новизна работы. Получена новая модельная система, состоящая из ИПСК пациентов со СМА I и II типов и здорового человека. При этом репрограммирование к плюрипотентному состоянию осуществлено с помощью эписомных векторов – практически не интегрирующихся в геном кольцевых молекул ДНК, обеспечивающих временную экспрессию факторов репрограммирования. Плюрипотентный статус полученных клеточных линий был подтвержден с помощью целого ряда тестов, включая формирование тератом – аналог самого строгого теста на химеризм, который невозможно провести для плюрипотентных клеток человека. Проведена направленная дифференцировка пациент-специфичных клеточных линий в моторные нейроны, демонстрирующие экспрессию маркеров зрелых двигательных нейронов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученная в данной работе модельная система может быть использована для комплексного изучения молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития спинальной мышечной атрофии, проведения фармакологических и токсикологических исследований.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, полученные из фибробластов пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типа с помощью эписомных векторов, демонстрируют генотип больных и свойства самообновления и плюрипотентности.
2. Моторные нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типа, являются адекватной модельной системой для изучения данного заболевания.

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Определение числа копий гена *SMN2* в полученных линиях ИПСК осуществлялось к.б.н. А.В. Киселевым. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа осуществлялся к.б.н. Ю.В. Мининой. Обработка материала тератом и гистологический анализ осуществлялся к.б.н. Е.А. Кизиловой и Л.А. Чугаевой.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на российских конференциях с международным участием, среди которых: VIII всероссийский с международным участием конгресс молодых ученых-биологов СИМБИОЗ-2015, г. Новосибирск; 2-й национальный Конгресс по регенеративной медицине, г. Москва, 2015; международный форум «Биомедицина-2016», г. Новосибирск. По материалам диссертации опубликовано две работы 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 135 страницах, содержит 21 рисунок и 7 таблиц. Библиографический указатель включает 239 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК из фибробластов кожи человека. Репрограммирование фибробластов к плюрипотентному состоянию проводили согласно ранее опубликованным протоколам (Okita et al., 2011, Okita et al., 2013), с некоторыми изменениями.

Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны. Направленную дифференцировку ИПСК в моторные нейроны проводили согласно протоколу (Du et al., 2015), который включал пять этапов.

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

Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vitro*. Дифференцировка в эмбрионных тельцах проводилась по стандартному протоколу (Medvedev et al., 2011).

Спонтанная дифференцировка ИПСК *in vivo*. Спонтанная дифференцировка в системе *in vivo* осуществлялась с помощью тератомного теста с последующим гистологическим анализом образованных опухолей.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Иммунофлуоресцентное окрашивание осуществляли стандартным способом (Medvedev et al., 2011).

Проточная цитофлуориметрия. Подсчет GFP-позитивных клеток производили на приборе BD FACSCanto II (BD Biosciences) согласно рекомендациям производителя.

Анализ кариотипа. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа проводили согласно протоколу, опубликованному ранее (Liskovykh et al., 2011).

Выделение РНК. РНК выделяли из культур клеток с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции фирмы производителя.

Синтез кДНК методом обратной транскрипции. Синтез кДНК проводили с помощью набора SuperScript III First Strand (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с помощью Taq-полимеразы и набора OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) (Григорьева, 2016).

ПЦР в реальном времени для определения количества копий эписом на клетку. Реакцию проводили по ранее описанному протоколу (Григорьева, 2016).

Мультиплексная ПЦР в реальном времени. Число копий гена *SMN2* определяли с помощью метода, описанного ранее (Zheleznyakova et al., 2011).

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Фрагменты ДНК разделяли в 1,5-3% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE с добавлением бромистого этидия (0,01 мкг/мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Определение оптимальной концентрации эписомной ДНК, используемой для репрограммирования

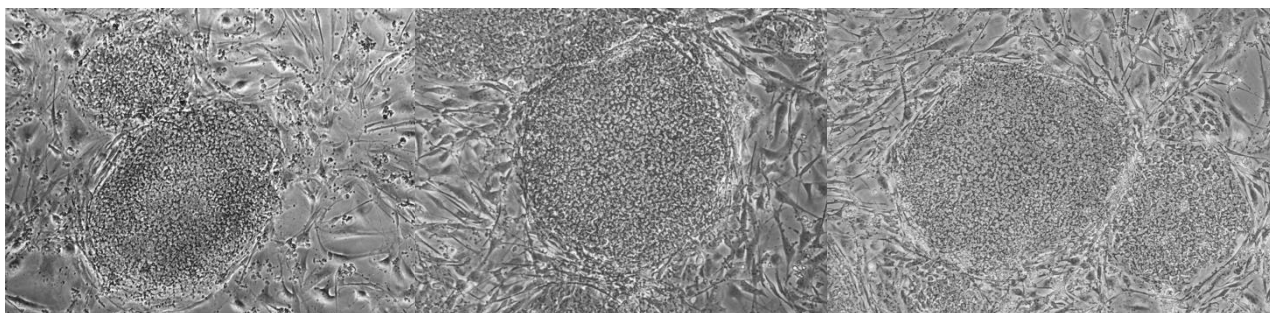
Определение оптимальной концентрации ДНК эписом, обеспечивающих экспрессию факторов репрограммирования, осуществлялось путем цитофлуориметрической оценки количества GFP-позитивных клеток через 48 часов после нуклеофекции фибробластов линии MA N1 эписомой pCE-GFP. Наибольшая эффективность нуклеофекции – 60% GFP-позитивных клеток, наблюдалась при использовании 3 мкг эписомной ДНК и режиме нуклеофекции P-022. Достаточно высокий процент GFP-позитивных клеток обусловлен, помимо прочего, целенаправленной доставкой oriP/EBNA-1 вектора в ядро и амплификацией эписом в течение 2 суток после нуклеофекции (Yu et al., 2011).

Оптимальная концентрация эписомной ДНК в пересчете на общее количество клеток составила 6 пг на 1 клетку или 595 молекул на 1 клетку, что на 1 пг (около 100 молекул) больше, чем аналогичное значение, полученное при первом опубликованном использовании данного набора эписом (Okita et al., 2011). Однако мониторинг количества GFP-позитивных клеток в течение нескольких пассажей показал, что через 28 дней культивирования количество клеток, демонстрирующих экспрессию GFP, снижается до фонового и составляет 0,2-0,5%.

Таким образом, не смотря на амплификацию эписомных векторов в клетке-реципиенте, обусловленную действием белкового продукта гена *EBNA-1*, с каждым пассажем происходит прогрессирующая элиминация эписомной ДНК. Однако время, в течение которого происходит элиминация, является достаточным для прохождения клеткой всех стадий репрограммирования (Okita et al., 2013).

1.2. Репрограммирование пациент-специфичных фибробластов

В результате эксперимента по репрограммированию фибробластов линии f1SMA (от пациента со SMA I типа) было получено двадцать девять линий ИПСК. В результате репрограммирования фибробластов линии m3SMA (от пациента со SMA II типа) и m34Sk (от здорового человека) было получено двадцать пять и семнадцать линий ИПСК, соответственно. Клетки всех полученных линий имели большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, интенсивно пролиферировали, росли однослойными плоскими колониями, схожими по морфологии с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) человека и экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу (Рисунок 1).



А

Б

В

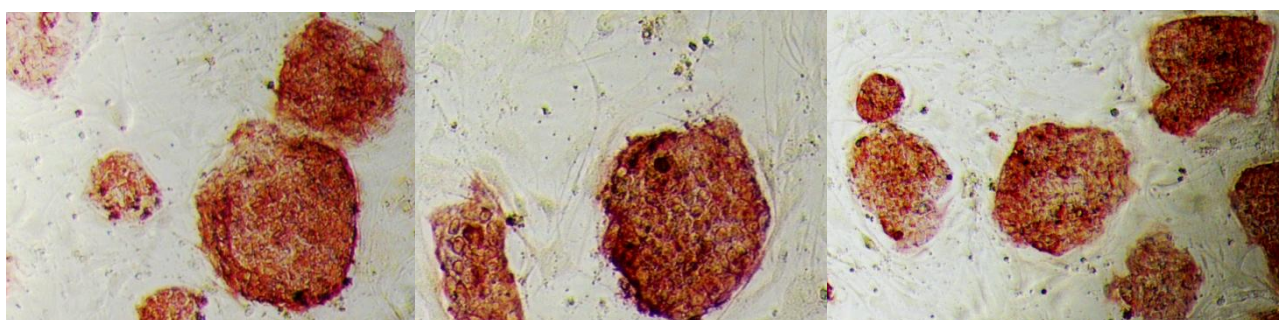


Рисунок 1. Морфология колоний ИПСК, полученных из пациент-специфичных фибробластов и окраска, демонстрирующая экспрессию щелочной фосфатазы.
 (А) – линия iSMA 40, получена из фибробластов f1SMA от больного СМА I типа;
 (Б) – линия m3SMA6, получена из фибробластов m3SMA от больного СМА II типа;
 (В) – линия m34Sk10, получена из фибробластов m34Sk от здорового человека.
 Увеличение x4.

Из полученных субклонов отбирали по 6-7 линий ИПСК, которые демонстрировали наиболее стабильную ЭСК-подобную морфологию и имели оптимальные культуральные свойства. Остальные линии подвергались заморозке. Некоторые из выбранных субклонов в процессе культивирования меняли свою морфологию: контакты между клетками в колонии становились менее плотными, края колонии – менее отчетливыми. Такие линии также подвергались заморозке. Таким образом, для длительного культивирования и последующей характеристики были отобраны по 3-4 линии от каждого пациента, характеризующиеся неизменной в течение длительного культивирования морфологией и высокой пролиферативной активностью (пересадка в соотношении 1:15-20 через каждые 3-5 дней)

Эффективность репрограммирования, оцененная как отношение количества колоний, положительно окрашивающихся на щелочную фосфатазу к исходному количеству клеток, составила ~0,1% (~ 100 колоний на 1×10^5 клеток). Полученные значения эффективности репрограммирования на порядок выше, чем аналогичные значения, полученные ранее при использовании данного набора эписом (Okita et al., 2011, Okita et al., 2013), и на несколько порядков выше, чем в первой опубликованной работе с использованием данного способа репрограммирования без интеграции трансгенов в геном (Yu et al., 2009). Большая эффективность, по

всей вероятности, связана с большим количеством эписомной ДНК, приходящейся на одну клетку-мишень.

1.3. Профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности

С помощью ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) была проанализирована транскрипция 13 генов, являющихся маркерами плюрипотентных стволовых клеток человека в 9 линиях ИПСК, полученных от больных СМА и здорового человека. Эмбриональные стволовые клетки человека линии HUES9 были взяты в качестве положительного контроля, а фибробласты линий f1SMA, m3SMA, m34Sk – в качестве отрицательного контроля. Было показано, что профиль экспрессии данных генов в выбранных линиях ИПСК в целом совпадает с таковым в ЭСК человека (Рисунок 2). В первую очередь, это касается экспрессии ключевых транскрипционных факторов, участвующих в установлении и поддержании самообновления и плюрипотентности, таких как *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*. Также была показана транскрипция таких надежных маркеров плюрипотентных клеток, как *TDGF1*, *REX1*, *DNMT3B*, *UTF1*, *NODAL*, *LEFTB*, *FGF4*, *GDF3* и *PODXL*. Белковые продукты перечисленных генов принимают участие в установлении и поддержании плюрипотентного состояния клеток как за счет регуляции транскрипции генов-мишеней, так и за счет стимуляции пролиферации, торможения апоптоза, установления соответствующих эпигенетических модификаций.

Стоит отметить, что в фибробластах линии f1SMA также была обнаружена экспрессия гена *PODXL*, кодирующего белок подокаликсин, участвующий в регуляции адгезивных свойств клеток (Debruijn et al., 2014). По всей вероятности, экспрессия данного гена является особенностью данной линии фибробластов. Кроме того, в некоторых работах показано, что нокаут *PODXL* в ЭСК человека изменяет ряд свойств этих клеток, но не ведет к полной потере плюрипотентности (Freedman et al., 2015).

Методом иммунофлуоресцентного окрашивания было показано, что линии ИПСК, взятые в анализ, демонстрируют экспрессию основных маркеров плюрипотентных клеток, таких как поверхностные антигены SSEA4, TRA-1-60, транскрипционные факторы *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* (Рисунок 2). TRA-1-60 и SSEA4 – маркеры клеточной поверхности плюрипотентных стволовых клеток человека, близкие по своим функциональным свойствам к *PODXL*. TRA-1-60 – кератан сульфатированный протеогликан, обеспечивающий межклеточные взаимодействия. SSEA4 – гликолипид, также играющий важную роль в обеспечении адгезивных свойств плюрипотентных клеток.

В процентном отношении количество *OCT4*⁺ клеток в проанализированных линиях варьировало от 80% до 98%. При этом для получения адекватных результатов, особенно при длительном культивировании ИПСК и переходе на различные культуральные поверхности, оптимальное содержание *OCT4*⁺ клеток должно составлять более 95%. Увеличение процентного содержания *OCT4* в общей популяции плюрипотентных клеток достигалось с помощью магнитного сортирования по поверхностному маркеру TRA-1-60.

Таким образом, с помощью двух различных методов была продемонстрирована экспрессия ключевых генов плюрипотентных клеток человека в полученных линиях ИПСК.

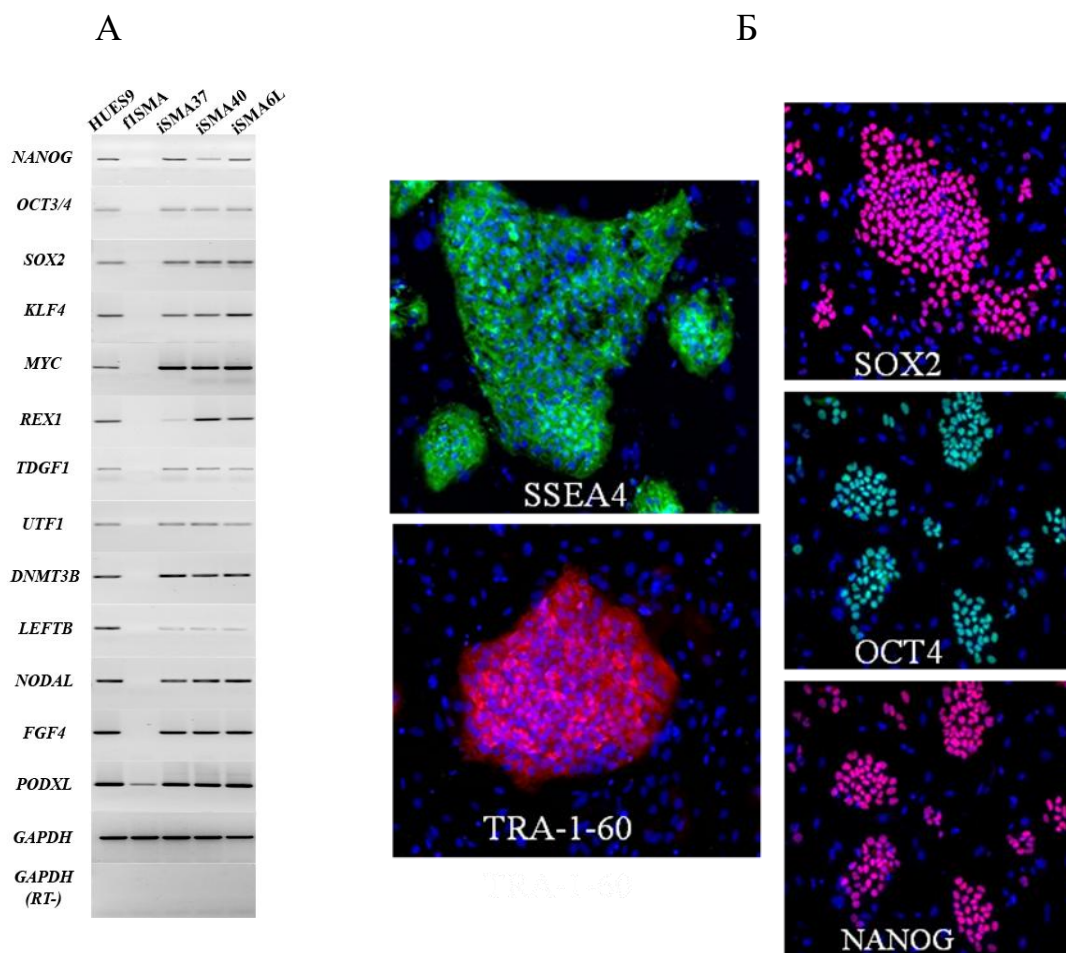


Рисунок 2. Анализ профиля экспрессии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности.

(А) ОТ-ПЦР анализ транскрипции генов, являющихся маркерами плюрипотентных стволовых клеток человека в ЭСК (HUES9), фибробластах (fSMA) и трех линиях ИПСК: iSMA37, iSMA40 и iSMA6L.

(Б) Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов OCT4, NANOG, SOX2, а также поверхностным антигенам SSEA4 и TRA-1-60 (линия iSMA40).

Увеличение x10. Синим окрашены ядра (DAPI).

1.4. Спонтанная дифференцировка ИПСК в эмбрионных тельцах

При культивировании полученных линий ИПСК в суспензии в отсутствие bFGF наблюдается образование характерных структур - эмбрионных телец, внутри которых происходят процессы интенсивной пролиферации и дифференцировки клеток. ОТ-ПЦР анализ клеток, полученных из распластанных эмбрионных телец на 28 день культивирования, показал наличие маркеров производных трех зародышевых листков (Рисунок 3). В частности была показана экспрессия PAX6 – транскрипционного фактора нейроэктодермы, MAP2 – белка, участвующего в сборке микротрубочек при нейрогенезе, GFAP – маркера клеток нейроглии, BRACHYURY – транскрипционного фактора, обеспечивающего развитие клеток мезодермального происхождения, SOX17 и FOXA2 – транскрипционных факторов энтодермы, а также AFP – белка, активно экспрессирующегося в эмбриональной печени и эпителии кишечника. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания

также показана экспрессия некоторых маркеров эктодермы – NF200 и TUJ1, мезодермы – α SMA, CD31, коллагена I типа, фибронектина, и энтодермы - СК18 (Рисунок 3).

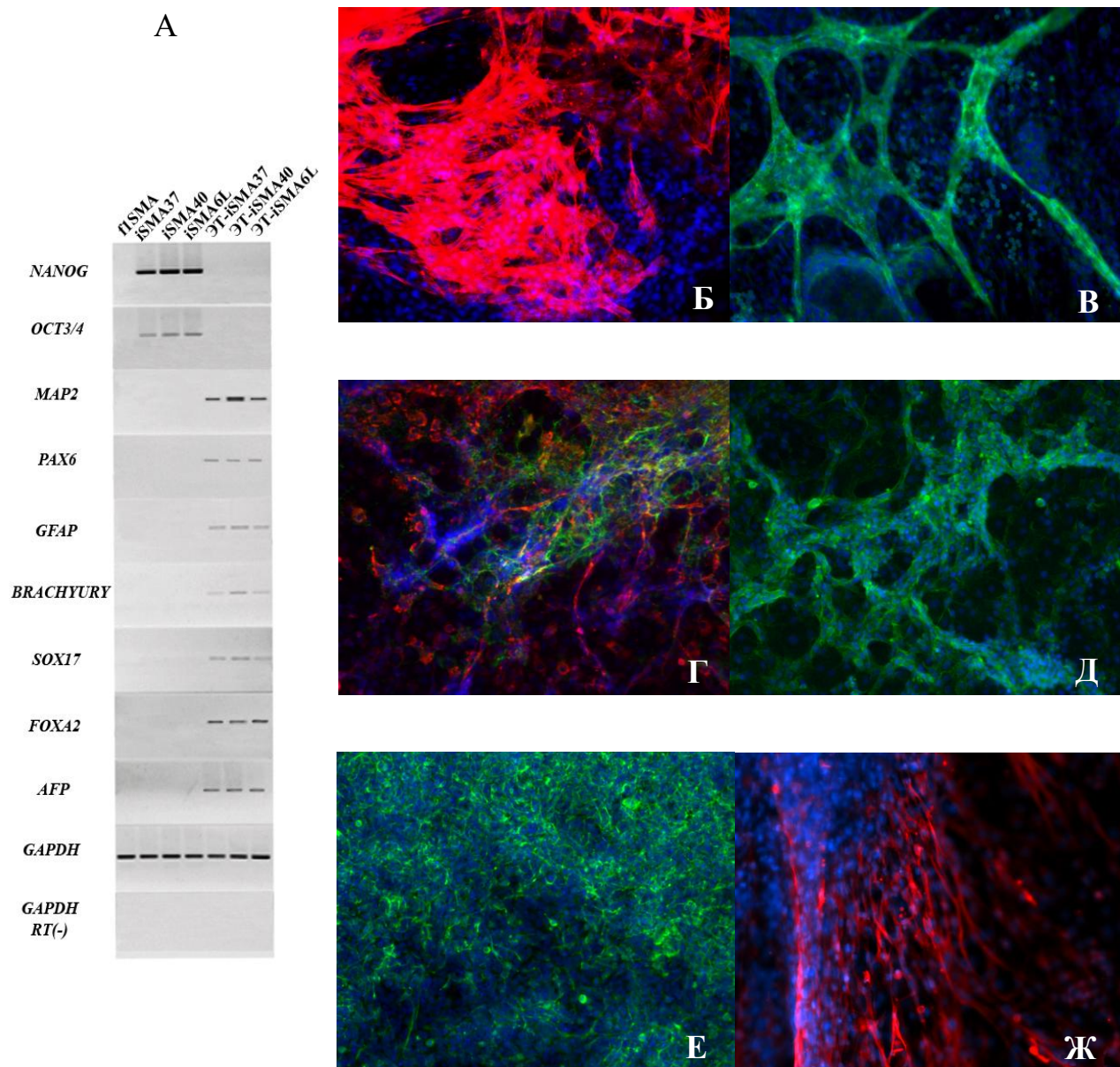


Рисунок 3. Экспрессия маркеров эктодермы, мезодермы и энтодермы при спонтанной дифференцировке ИПСК в эмбрионных тельцах.

(А) ОТ-ПЦР анализ транскрипции генов, являющихся маркерами производных трех зародышевых листков (экто-, мезо-, и энтодермы), при спонтанной дифференцировке ИПСК iSMA37, iSMA40 и iSMA6L.

Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию производных трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке ИПСК iSMA37, iSMA40 и iSMA6L: мезодермы α SMA (Б), CD31 (В), коллаген I типа – красный, фибронектин – зеленый (Г) (совмещение); энтодермы СК18 (Д); эктодермы NF200 (Е), TUJ1 (Ж). Увеличение $\times 4$. Синим окрашены ядра (DAPI).

Таким образом, плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки *in vitro*.

1.5. Тератомный тест

Для линий ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 и m34Sk14 был проведен тест на дифференцировку *in vivo* – формирование тератом у иммунодефицитных мышей линии SCID. При этом были выбраны два способа введения – подкожно в загривок с матриксом Geltrex и внутримышечно в голень. В среднем в течение 7-8 недель в месте введения наблюдалось формирование солидных опухолей (частота формирования - 70%), материал которых был направлен на гистологический анализ.

Чаще всего однократная инъекция приводила к появлению единственной опухоли *in situ*. У некоторых опытных животных в результате подкожной (реже - глубокой внутримышечной) инъекции образовывались 2 или 3 независимые опухоли, также локализованные *in situ* (частота формирования - 15%).

По результатам гистологического анализа полученных проб показано, что в тератомах, образованных после введения ИПСК линий iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 присутствуют основные диагностические морфотипы производных трех зародышевых листков – экто-, эндо-, и мезодермы (Рисунок 4).

Среди производных эктодермы были обнаружены различные типы эмбрионального нейроэпителия, многослойного ороговевающего и неороговевающего эпителия. Среди производных мезодермы были выявлены участки хрящевой, костной, мышечной, соединительной, жировой ткани, а также участки эритро- и лимфопоэза. Среди производных энтодермы обнаружены участки эпителия кишечной трубки, в том числе секреторирующего эпителия, а также островки гепатоцитов.

После введения ИПСК линии m34Sk14 образовалась только одна опухоль *in situ*, гистологический анализ которой выявил наличие производных только одного зародышевого листка – мезодермы. Таким образом, данная линия не прошла тератомный тест.

В структуре изученных образцов тератом были обнаружены несколько клеточных ансамблей и ассоциаций (от 2 до 5 в зависимости от линии), таких как разнообразные эпителиальные трубки, а также комплексы трубок с железистой тканью, комплексы хрящевой и костной ткани, костной и гемопоэтической ткани, костной и плотной соединительной ткани. Кроме того отмечалась закладка целого органа – эмбриональной кишки.

Во всех опухолях были обнаружены малигнизированные участки, что, однако, не позволяет однозначно судить о туморогенном потенциале исследованных линий ИПСК. Однако в данном эксперименте не было выявлено так называемых добавочных опухолей *ex situ* (лимфомы, саркомы и ряд других опухолей), что говорит о невысокой злокачественной активности исследованных линий ИПСК (Кизилова, 2016).

Таким образом, по результатам теста на спонтанную дифференцировку в системе *in vivo* было показано, что линии ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 образуют производные трех зародышевых листков, следовательно, можно сделать вывод о плюрипотентности данных клеточных линий.

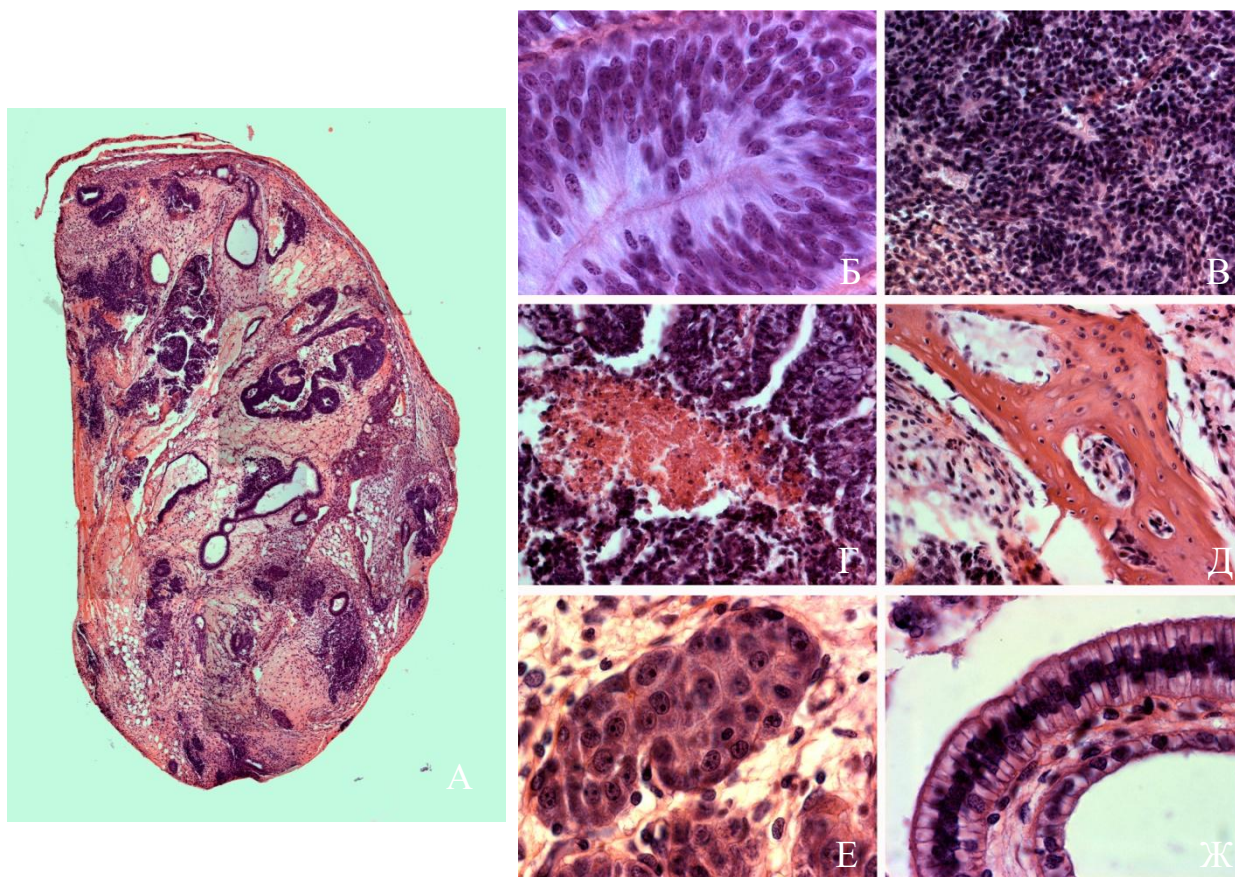


Рисунок 4. Результаты тератомного теста для линии ИПСК iSMA6L

(А) – Реконструкция общего вида тератомы. Увеличение x10.

(Б, В) – производные эктодермы: различные виды эмбрионального нейроэпителия, Увеличение x100 (Б), x20 (В).

(Г, Д) – производные мезодермы: очаг кроветворения (Г), костная ткань с очагом кроветворения (Д). Увеличение x20.

(Е, Ж) – производные энтодермы: островки гепатоцитов (Е), эпителий кишечной трубки (Ж). Увеличение x100.

Данные любезно предоставлены к.б.н., с.н.с. Кизиловой Е. А.

1.6. Кариотипирование полученных линий ИПСК

Анализ кариотипа показал, что 71,9% фибробластов линии f1SMA, использованной для репрограммирования, на девятом пассаже имеют нормальный кариотип 46, XX. Однако при длительном культивировании (несколько десятков пассажей) полученные ИПСК накапливают хромосомные нарушения, выявляемые рутинным кариотипированием. Так, линия ИПСК iSMA6L на 13 пассаже демонстрирует кариотип, близкий к норме – 70% клеток имеют кариотип 46, XX (Рисунок 5). В то время как, около половины клеток линий iSMA37 и iSMA40, пройдя два десятка пассажей, имеют хромосомные аномалии. Линия iSMA37 продемонстрировала наиболее нестабильный кариотип – на 20 пассаже только 18,4% имеют нормальный кариотип. Следовательно, для получения адекватных результатов при изучении клеточной модели СМА, необходимо использовать ИПСК на ранних пассажах культивирования.

Полученные результаты согласуются с данными о том, что при длительном культивировании плюрипотентных стволовых клеток человека и животных происходит накопление различных хромосомных аномалий (Martins-Taylor, Xu, 2012). Помимо грубых нарушений, таких, как полиплоидизация, особенно тетраплоидия и трисомия по хромосомам, несущим факторы роста, плюрипотентные клетки способны накапливать хромосомные нарушения, которые невозможно выявить рутинным кариотипированием (Laurent et al., 2011).

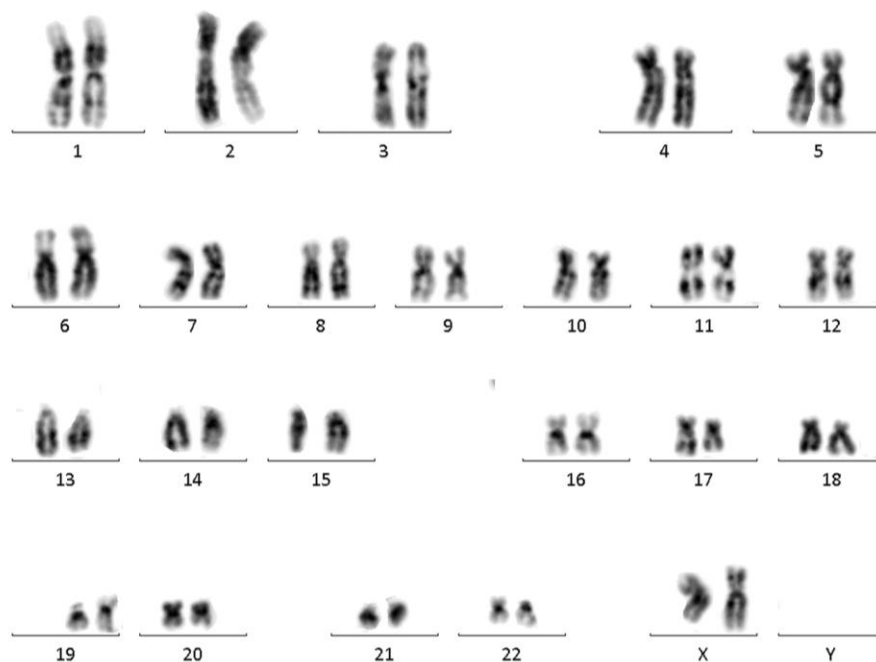


Рисунок 5. Кариотип ИПСК линии iSMA6L.
Данные любезно предоставлены к.б.н., н.с. Мининой Ю. В.

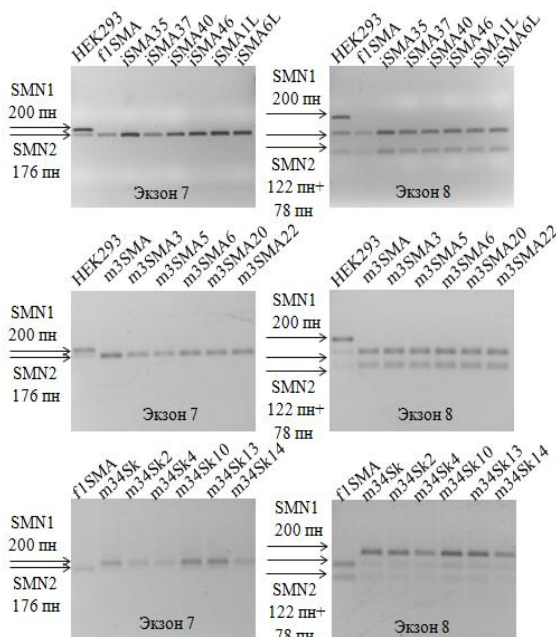
1.7. Характеристика генотипа пациент-специфичных ИПСК

С помощью ПЦР-ПДРФ (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) было показано, что во всех линиях ИПСК, полученных от пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типов, отсутствуют 7 и 8 экзоны гена *SMN1* (Рисунок 6). На электрофорезе видны только продукты рестрикции гена *SMN2*. При этом линии ИПСК, полученные от здорового человека, имеют нормальный генотип – видны продукты амплификации 7 и 8 экзонов как гена *SMN1*, так и *SMN2* (Рисунок 6).

С помощью мультиплексной ПЦР в реальном времени было показано, что в линиях ИПСК, полученных от пациента со СМА I типа содержится 2 копии гена *SMN2*, в линиях ИПСК, полученных от пациента со СМА II типа – 3 копии *SMN2*, в линиях ИПСК, полученных от здорового человека – 1 копия *SMN2* (Рисунок 6). Представленные значения соответствуют наиболее распространенным генотипам СМА (McAndrew et al., 1997): 2 копии *SMN2* и гомозиготная делеция *SMN1* - наиболее распространенный генотип у пациентов со СМА I типа, 3 копии *SMN2* и делеция *SMN1* - наиболее распространенный генотип у пациентов со СМА II типа. Что касается нормального контроля, то полученные значения (1 копия *SMN2*) также не являются уникальными, поскольку у 5-9% здоровых людей вообще не

обнаруживается гена *SMN2* (Gerard et al., 2000). Следовательно, ИПСК, полученные от данного пациента могут быть использованы в качестве нормального контроля при создании клеточной модели СМА.

А



Б

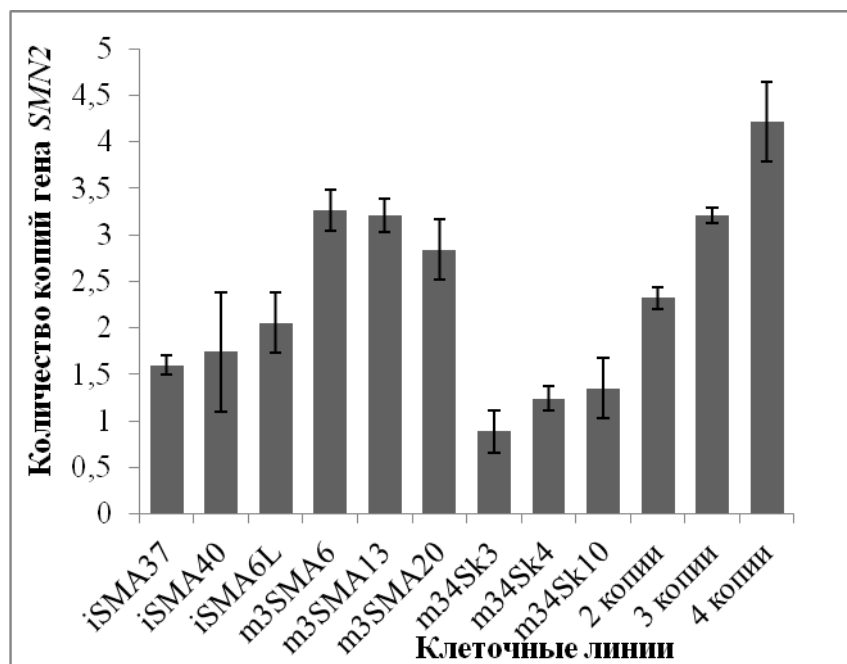


Рисунок 6. Характеристика генотипа пациент-специфичных ИПСК.

(А) ПЦР-ПДРФ анализ для выявления гомозиготной делеции 7 и 8 экзонов гена *SMN1*.

(Б) Результаты мультиплексной ПЦР в реальном времени по определению числа копий гена *SMN2*.

1.8. Анализ копийности эписом в полученных ИПСК

Эписомные вектора, используемые для репрограммирования к плюрипотентному состоянию, элиминируются из клеток при длительном культивировании. Данный процесс обусловлен сайлесингом промотора, запускающего транскрипцию *EBNA-1*, продукт которого отвечает за амплификацию эписом, и дефектами синтеза, что обеспечивает исчезновение данных молекул со скоростью примерно 5% на клеточный цикл в отсутствие каких-

либо дополнительных манипуляций с культурой клеток. Однако с определенной частотой данные вектора все же способны встраиваться в геном.

С помощью ПЦР в реальном времени было определено количество копий эписом на клетку через 120 дней культивирования (Рисунок 7). Из девяти проанализированных линий ИПСК в одной (iSMA6L) была обнаружена встройка эписомного вектора, в одной (m3SMA13) - полная элиминация эписом, в трех (iSMA37, iSMA40, m3SMA6) - практически полная, в четырех (m3SMA20, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10) - частичная.

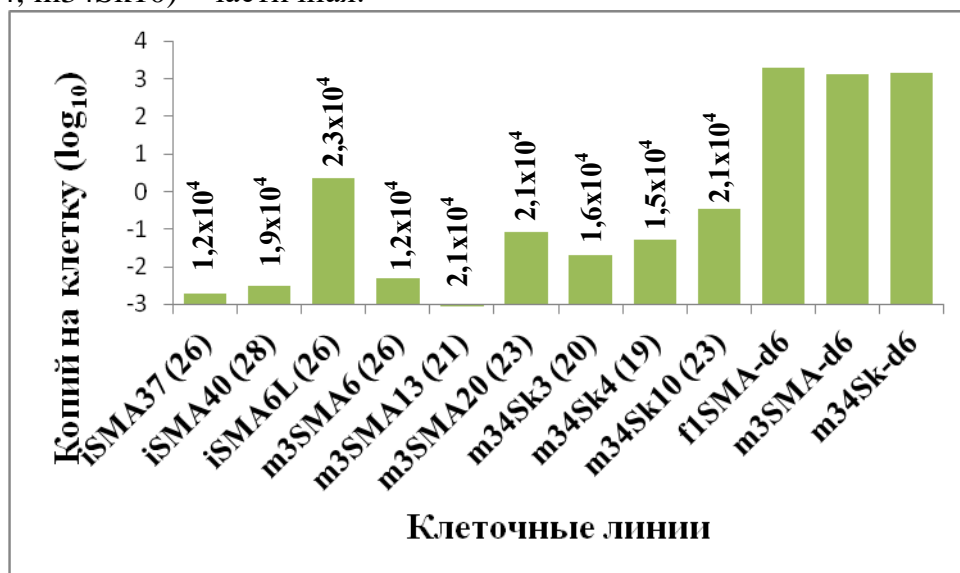


Рисунок 7. Результаты ПЦР в реальном времени по определению числа копий эписом в полученных линиях ИПСК через 120 дней культивирования. В скобках указан пассаж. Цифры над столбцами обозначают количество клеток в экспериментальном образце. Три линии фибробластов на 6 день культивирования после нуклеофекции эписомами в количестве 3 мкг взяты в качестве положительного контроля (f1SMA-d6, m3SMA-d6, m34Sk-d6).

1.9. Направленная дифференцировка ИПСК в моторные нейроны

ИПСК от пациентов со СМА и здорового человека запускались в дифференцировку параллельно. Было использовано по две линии от каждого пациента: iSMA37, iSMA40 от больного СМА I типа, m3SMA13 и m3SMA20 от больного СМА II типа, m34Sk3 и m34Sk10 от здорового человека. Выбор линии был обусловлен результатами проведенных тестов. Линии ИПСК, демонстрирующие в тесте на спонтанную дифференцировку *in vitro* тенденцию к преимущественному образованию нейральных производных, были использованы в первую очередь. При этом ИПСК предварительно не адаптировали к культивированию на слое базальных белков Matrigel, а запускали в дифференцировку уже на следующий день после пересадки на Matrigel.

Все стадии нейральной дифференцировки от предшественников моторных нейронов до зрелых моторных нейронов были пройдены клетками разных линий с примерно одинаковой эффективностью. На стадии нейроэпителиальных предшественников показана экспрессия основного маркера данного типа клеток – транскрипционного фактора SOX1, а также транскрипционного фактора PAX6 (Рисунок 8). Среднее количество SOX1+ клеток на 9 день дифференцировки составило 90%, PAX6+ клеток – 71%.

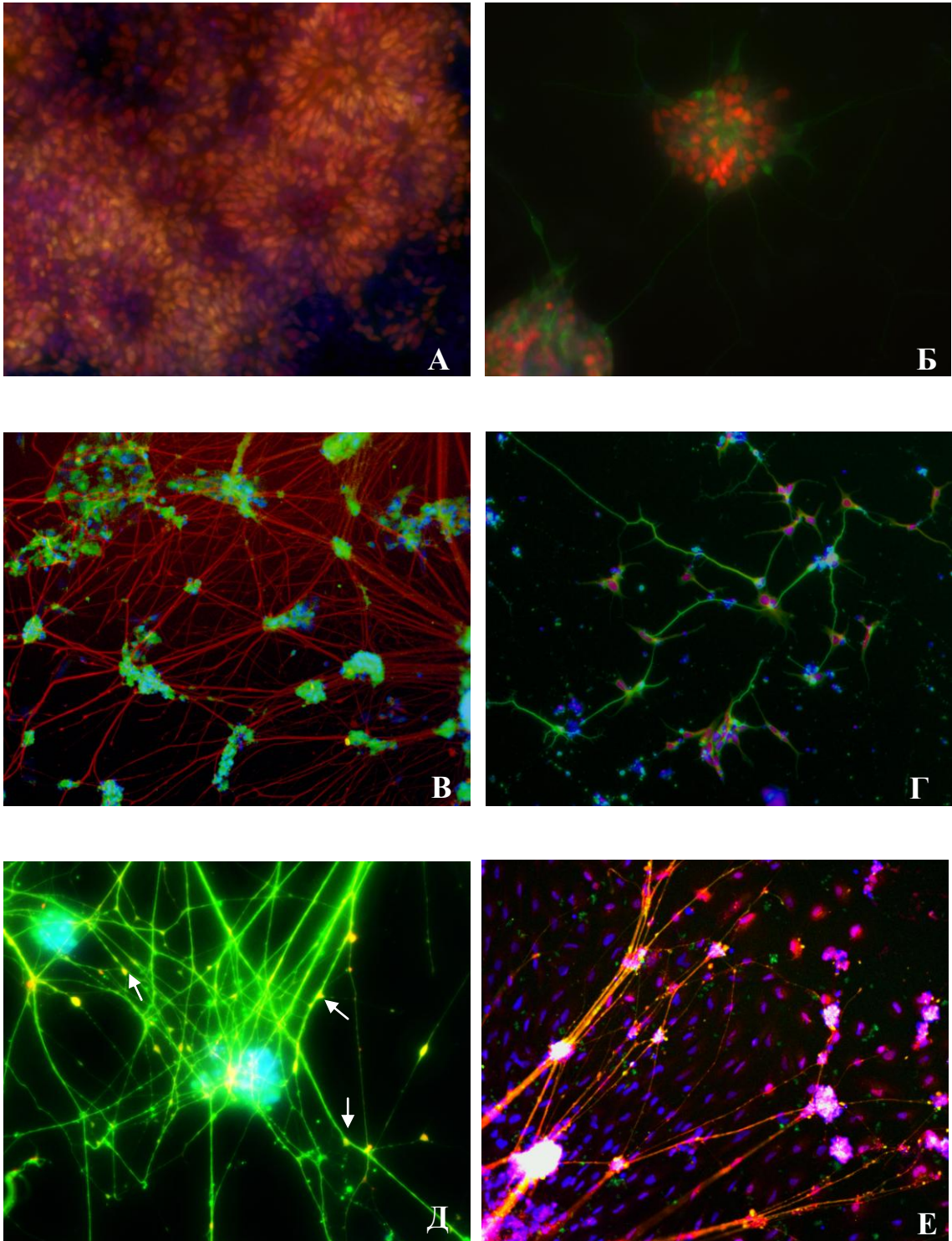


Рисунок 8. Иммунофлуоресцентное окрашивание, демонстрирующее экспрессию нейральных маркеров. Синим окрашены ядра (DAPI).

(А) Совмещение: SOX1 – красный, PAX6 – зеленый; увеличение 20х.

(Б) Совмещение: OLIG2 – красный, TUJ1 – зеленый; увеличение 20х.

(В) Совмещение: HB9 – зеленый, NF200 – красный; увеличение 10х.

(Г) Совмещение: ISL1 – красный, TUJ1 – зеленый; увеличение 10х.

(Д) Совмещение: SYNI – красный, TUJ1 – зеленый, стрелками показана локализация синапсов; увеличение 20х.

(Е) Совмещение MAP2 – красный, CHAT – зеленый; увеличение 10х.

На стадии предшественников моторных нейронов клетки демонстрировали экспрессию OLIG2 (Рисунок 8) – основного маркера данного клеточного типа. Причем на данной стадии дифференцировки клетки культивировали в течение нескольких пассажей, а также подвергали заморозке. При этом было показано, что экспрессия OLIG2 сохраняется на исходном уровне. Среднее количество OLIG2+ клеток на 18 день дифференцировки составило 54%. Полученное значение ниже, чем в исходном протоколе (Du et al., 2015). По всей вероятности, это обусловлено тем, что часть клеток дифференцировалась в другом направлении – IRX3+ клеток и NGN3+ клеток, являющихся предшественниками нейронов другого типа, отличного от моторных нейронов спинного мозга (Davis-Dusenbery et al., 2014).

На третьей неделе дифференцировки после прохождения стадии нейросфер клетки приобретали морфологию, характерную для моторных нейронов – тонкие длинные отростки, отходящие от тела, а также многочисленные сложные синапсы между клетками. Среднее количество ISL1+ клеток на 28 день дифференцировки составило 56%. Данный транскрипционный фактор, наряду с HB9 (Рисунок 8), ISL2, LHX3 является маркером моторных нейронов спинного мозга (Novitsch et al., 2001). Количество ISL1+ моторных нейронов практически соответствует количеству OLIG2+ предшественников моторных нейронов. Отсюда можно сделать вывод, что заключительные этапы дифференцировки идут без значительных отклонений от исходного протокола.

На заключительной стадии дифференцировки была показана экспрессия СНАТ (ацетилхолинтрансфераза) (Рисунок 8) – фермента, обеспечивающего биосинтез ацетилхолина, который является нейромедиатором, используемым для передачи нервного импульса моторными нейронами, т.е. осуществляющим нервно-мышечную передачу. Поэтому данный белок является маркером зрелых моторных нейронов, способных осуществлять свою основную функцию. Отростки зрелых моторных нейронов формируют между собой многочисленные синапсы. В участках формирования синапсов показана экспрессия белка SYNI (Рисунок 9). Данный белок является одним из основных структурных элементов синаптической мембраны и маркером зрелых функциональных синаптических контактов.

Также на стадии зрелых нейронов была отмечена сниженная жизнеспособность моторных нейронов, полученных из ИПСК пациента со СМА I типа по сравнению с контрольными линиями. Однако при добавлении в среду нейротрофических факторов выживаемость моторных нейронов повышалась. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что на поздних стадиях дифференцировки моторные нейроны от больных СМА демонстрируют патологические отклонения в фенотипе, характерные для данного заболевания (Ebert et al., 2009).

Таким образом, в результате направленной дифференцировки ИПСК от больного СМА I, II типа и здорового человека были получены моторные нейроны, экспрессирующие основные маркеры данного типа нервных клеток. При этом средняя эффективность дифференцировки составила 56%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спинальная мышечная атрофия (СМА) - одно из наиболее распространенных наследственных нейродегенеративных заболеваний. Наиболее тяжелые формы СМА I и II типа манифестируют в раннем детском возрасте. Как и для большинства нейродегенеративных заболеваний, для СМА до сих пор не существует

эффективного лечения, и больные вынуждены ограничиваться только различными поддерживающими терапевтическими методами. Такие больные нуждаются в квалифицированном уходе, специальных средствах гигиены и питания, а также в респираторной поддержке. Все эти факторы в определенной степени могут продлить жизнь больного на некоторое количество месяцев или лет, но не улучшают ее качества.

Для выяснения патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели моторных нейронов при СМА, в настоящее время активно изучаются производные индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) больных СМА. Релевантность клеточных моделей, представленных моторными нейронами, демонстрирующими фенотип СМА, подтверждена во многих работах (Valetdinova et al., 2015). С помощью данных моделей обнаруживаются новые аспекты этиопатогенеза СМА, тестируются потенциальные лекарственные препараты.

В представленной работе получена новая модельная система, состоящая из пациент-специфичных клеток больных СМА I и II типа и здорового человека. Эта модель послужит основой для исследования особенностей данного заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также для разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, и скрининга больших панелей потенциальных лекарственных соединений.

ВЫВОДЫ

1. В результате репрограммирования фибробластов с использованием эписомных векторов были получены линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов со СМА I, II типа и здорового человека.

2. Установлено, что полученные линии ИПСК имеют морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека, демонстрируют экспрессию щелочной фосфатазы и основных маркеров плюрипотентных клеток.

3. Показано, что при спонтанной дифференцировке полученных линий ИПСК в эмбрионидных тельцах образуются производные трех зародышевых листков.

4. Показано, что при спонтанной дифференцировке полученных линий ИПСК *in vivo* в тератомном тесте образуются производные трех зародышевых листков.

5. Обнаружено, что кариотип полученных линий ИПСК наиболее близок к норме на ранних пассажах культивирования, при длительном культивировании наблюдается увеличение количества анеуплоидных клеток.

6. Установлено, что соответствующие линии ИПСК демонстрируют генотип больного СМА I типа: гомозиготная делеция 7 экзона гена *SMN1*, 2 копии гена *SMN2*, больного СМА II типа – делеция 7 экзона гена *SMN1*, 3 копии гена *SMN2*, здорового человека – отсутствие делеции в гене *SMN1*, 1 копия гена *SMN2*.

7. Через 120 дней культивирования из девяти проанализированных линий ИПСК в одной (iSMA6L) была обнаружена встройка эписомного вектора, в одной (m3SMA13) - полная элиминация эписом, в трех (iSMA37, iSMA40, m3SMA6) - практически полная, в четырех (m3SMA20, m34Sk3, m34Sk4, m34Sk10) - частичная.

8. Обнаружено, что направленная дифференцировка полученных линий ИПСК в моторные нейроны приводит к появлению клеток, демонстрирующих экспрессию основных маркеров двигательных нейронов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Валетдинова К.Р.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств // Acta Naturae. 2015. Т.7. №1(24). С. 92-109.
2. Григорьева Е.В., **Валетдинова К.Р.**, Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Медведев С.П., Мазурок Н.И., Маретина М.А., Куранова М.Л., Киселев А.В., Баранов В.С., Закиян С.М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии // Гены и клетки. 2016. Т. XI. № 2. С. 70-81.
3. **Валетдинова К.Р.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Модельные системы болезней моторных нейронов на основе плюрипотентных стволовых клеток человека // Материалы VIII всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов. Новосибирск. 2015. С. 21.
4. **Валетдинова К.Р.**, Устьянцева Е.И., Медведев С.П., Закиян С.М. Получение модельных систем болезней моторных нейронов на основе плюрипотентных стволовых клеток человека // 2-й национальный Конгресс по регенеративной медицине. Материалы конгресса. Москва. 2015. С. 38.
5. **Валетдинова К.Р.**, Григорьева Е.В., Закиян С.М. Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека // Сборник материалов форума «Биомедицина-2016». Новосибирск. 2016. С. 15.

