

На правах рукописи

СУЛЬДИНА ЛЮБОВЬ АЛЕКСАНДРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С УВЕЛИЧЕННЫМ
ЧИСЛОМ CAG ПОВТОРОВ В ГЕНЕ *HTT*, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ
ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА ИЛИ В
РЕЗУЛЬТАТЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**

1.5.22. – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в секторе структурной биологии клетки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Киселева Елена Владимировна**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора структурной биологии клетки ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Айдагулова Светлана Владимировна**

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск

Огиенко Анна Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного деления ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. на заседании диссертационного совета 24.1.239.01 (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. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

факс: +7(383) 333-12-78

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

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Болезнь Хантингтона (БХ) – генетическое нейродегенеративное заболевание, вызываемое увеличением числа CAG повторов в гене хантингтина (*HTT*), приводящем к удлинению полиглутаминового тракта в этом белке (MacDonald et al., 1993). Нормальным количеством повторов считается 10-35, когда их число превышает 40, вероятность развития болезни у носителя близка к 100% (Nopoulos, 2016). Удлинение полиглутаминовых трактов приводит к агрегации молекул мутантного хантингтина (mHtt) между собой и с другими белками. Агрегаты формируются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток (DiFiglia et al., 1997). Роль Htt в клетке все еще не до конца ясна, однако известно, что, взаимодействуя с множеством других белков, он участвует в регуляции везикулярного транспорта, синаптической передачи, апоптоза и транскрипции генов в нервных клетках (Nopoulos, 2016), а также влияет на биогенез митохондрий и функцию ЭПР (Hwang et al., 2015; Jiang et al., 2016).

Исследования механизмов развития нейродегенеративных заболеваний тесно связаны с разработкой клеточных моделей, полученных как с использованием клеточного материала от пациентов, так и созданных с помощью методов редактирования генома (Zhang, Bailus et al. 2016). Функциональные изменения нейронов при БХ активно изучаются (Wanker et al., 2019; Smith-Dijak et al., 2019), однако, многие особенности развития этого заболевания, особенно на клеточном уровне, пока недостаточно исследованы. Высокоразрешающая электронная микроскопия в сочетании с морфометрическим анализом клеточных параметров позволяет более детально оценить нарушения структурной организации клеток с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, что необходимо для понимания механизмов, лежащих в основе развития этого нейродегенеративного заболевания.

Целью настоящего исследования является выявление и изучение последствий увеличения числа CAG повторов в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин, в ультраструктурной организации клеток и цитоплазматических органелл с использованием различных клеточных моделей болезни Хантингтона.

Задачи исследования:

1. Исследовать и сравнить ультраструктурную организацию цитоплазматических органелл, включая ЭПР, митохондрии и аутолизосомы, в двух клеточных моделях болезни Хантингтона: пациент-специфичных (42-47 CAG повторов в гене *HTT*) и генетически модифицированных (69 CAG повторов в гене *HTT*) культур нейронов.
2. Провести сравнительный анализ влияния увеличения числа CAG повторов в гене *HTT* на организацию структур, отвечающих за передачу нервного сигнала: дендритов, шипиков и синапсов, в культурах пациент-специфичных и

генетически модифицированных нейронов (42-47 и 69 CAG повторов, соответственно).

3. Исследовать особенности ультраструктуры органелл в генетически модифицированных клетках НЕК293 с большим числом CAG повторов (100-150) в гене *HTT*.

4. Оценить влияние ингибитора кальциевых каналов EVR4593 на ультраструктуру органелл пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами в гене *HTT*.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ и охарактеризованы дефекты работы органелл в клетках с различным увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*: пациент-специфичных нейронах (42-47 CAG повтора); генетически модифицированных нейронах (69 CAG повторов) и генетически модифицированных клетках НЕК293 (100-150 CAG повторов). Показано, что все исследованные клетки с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* характеризуются схожими нарушениями морфологии 3-х типов органелл: шероховатого и гладкого ЭПР (везикуляция мембран); митохондрий (дефекты оболочек, крист и матрикса) и аутолизосом (нарушение целостности мембраны). Продемонстрирована корреляция между увеличением до 69 числа CAG повторов в гене *HTT* в генетически модифицированных нейронах и появлением нарушений в строении синапсов, дендритов и шипиков, а также ростом числа гибнущих клеток. Впервые в цитоплазме генетически модифицированных клеток НЕК293 со 100-150 CAG повторами в гене *HTT* выявлены четырёхслойные мембраны, формирующиеся в результате взаимного слияния двух цистерн шероховатого ЭПР. Высказано предположение, что причиной этого может быть нарушение состава фосфолипидных мембран ЭПР. Впервые показано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVR4593 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами в гене *HTT*.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение в области изучения особенностей развития клеточных дефектов при БХ и поиска подходов для замедления ее развития. Впервые установлено, что нейроны с разным увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* характеризуются существенным нарушением строения функционально важных для клеток органелл: митохондрий, мембран ЭПР и аутолизосом. Увеличение числа CAG повторов в гене до 69 вызывает дополнительно нарушение организации дендритов, шипиков и синапсов - структур нейронов, отвечающих за передачу нервного импульса. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 100-150 в клетках НЕК293 сопровождается появлением в цитоплазме атипично слипшихся мембран ЭПР. Впервые продемонстрировано, что ингибирование

депо-зависимых кальциевых каналов с помощью EVP4593 положительно сказывается на морфологии клеток пациент-специфичных нейрональных культур с 47 CAG повторами в гене HTT, а именно снижает число дефектных митохондрий и аутолизосом.

Положения, выносимые на защиту:

1. В пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом CAG в гене *HTT* выраженность нарушений структурной организации цитоплазматических органелл – шероховатого и гладкого ЭПР, митохондрий и аутолизосом, а также структур, отвечающих за передачу нервного сигнала – дендритов, шипиков и синапсов, зависит от числа этих повторов.

2. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 100-150 в генетически модифицированных клетках HEK293 приводит к нарушениям в строении мембран ЭПР, митохондрий и аутолизосом, вплоть до появления в цитоплазме атипично слипшихся мембран ЭПР, формирующих четырёхслойные структуры.

3. Ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVP4593 оказывает положительное влияние на морфологию пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами, снижая число дефектных митохондрий и аутолизосом.

Апробация результатов.

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на научных конференциях: Первая международная научно-практическая конференция «Геномное редактирование в медицинской генетике» (Москва, 2017), «International congress Crispr-2018» (Новосибирск, 2018), «Международная конференция «Беляевские чтения», посвященная 100-летию со дня рождения ак. Д.К. Беляева» (Новосибирск, 2017), «XXVI и XXIX Российская конференция по электронной микроскопии» (РКЭМ 2016, РКЭМ 2022) (Черноголовка, 2016, 2022), Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), Molecular mechanisms of autophagy in diseases (Санкт-Петербург, 2020), международный конгресс Bioinformatics of genome regulation and structure/system biology (BGRS/SB-2022) (Новосибирск, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано шесть работ в журналах, входящих в список ВАК из них 5 зарубежных.

Личный вклад автора: Весь экспериментальный материал был зафиксирован, подготовлен и изучен на срезах в просвечивающем электронном микроскопе, а также проанализирован и оценен с помощью морфометрического анализа автором самостоятельно.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и библиографического списка. Работа изложена на 157 страницах

машинописного текста, содержит 36 рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает 278 источников.

Благодарности. Автор благодарит сотрудников лаборатории генетических основ клеточных технологий института общей генетики им. Н. И. Вавилова (ИОГен РАН) Некрасова Е.Д., Лагарькову М.А., Киселева С.Л., а также сотрудников лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН Маланханову Т.Б., Григорьеву Е.В. и Малахову А.А. за предоставленные клеточные культуры. Работа была выполнена на оборудовании ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованный в работе клеточный материал. Две пациент-специфичных культуры средних шипиковых нейронов (СШН), МА2 и Че3, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые были получены из фибробластов 2-х пациенток с клинически диагностированной БХ (в МА2 число повторов в двух аллелях составляло 47/16, в Че3 - 42/27, соответственно) были предоставлены сотрудниками лаборатории генетических основ клеточных технологий ИОГен РАН (Nekrasov et al., 2016). В качестве контроля использовались нейроны, дифференцированные из ранее полученных в той же лаборатории линии ИПСК iPS12 и линии ЭСК ES5, имевшие менее 29 CAG повторов в гене *HTT*. Также были предоставлены культуры нейронов МА2 и ES5 после их инкубации в течение 14 часов с 1 мкМ ингибитора кальциевых каналов EVP4593 (Nekrasov et al., 2016).

Генетически модифицированные СШН культур 69Q9T и 69Q25L со встройкой 69 CAG повторов в ген *HTT*, были дифференцированы из ИПСК, полученных из фибробластов, генетически модифицированных с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. В качестве контроля использовались культуры МА1L (изогенная) и r2LF (неизогенная), содержащие 20-22 CAG повтора в гене *HTT*. Культуры были предоставлены сотрудниками лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН (Malankhanova et al., 2020). На основе клеток НЕК293 (Human embryonic kidney 293, иммортализованной лабораторной линии клеток эмбриональной почки человека) исходных линий Phoenix и FT в этой же лаборатории были получены клоны 6H и F1, соответственно, содержащие 100-150 CAG повторов в гене *HTT* (Suldina et al., 2018).

Электронная микроскопия и морфометрический анализ. Клетки, выращенные на пластиковых подложках, фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом в 0.1M какодилатном буфере, затем 1% OsO₄, инкубировали с 1% UAc, обезвоживали в спирте, ацетоне и заключали в Agar100 Resin. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEOL JEM-1400 (Япония). Количество митохондрий подсчитывалось на микрофотографиях тел

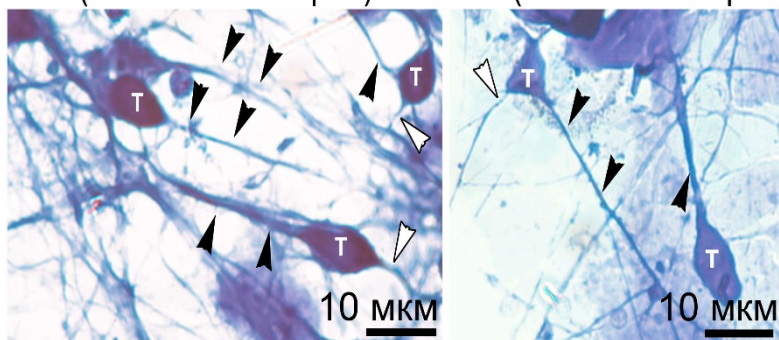
не менее чем 20 нейронов для каждой экспериментальной группы при увеличении $\times 20\ 000$, а затем определялась доля органелл (в %) с тем или иным дефектом от общего числа митохондрий на срезе клетки. Аналогично определялась доля митохондрий, контактирующих с ЭПР. Относительное число аутолизосом оценивалось как количество аутолизосом на $1\ \mu\text{м}^2$ цитоплазмы на микрофотографиях не менее чем 20 клеток на увеличении $\times 5000$. Аналогично оценивалась плотность синаптических везикул на $1\ \mu\text{м}^2$ площади не менее чем 10 синаптических окончаний на увеличении $\times 30\ 000$. Плотность шипиков определялась как отношение количества шипиков на отростке к его длине на микрофотографиях при увеличении $\times 10\ 000$ не менее чем 10 нейронов в каждой исследованной культуре. Измерения были выполнены с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Для статистического анализа морфометрические данные были проверены на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка, и при не нормальном распределении достоверность различий сравниваемых средних величин проверяли по критерию Манна-Уитни (Malkeyeva et al., 2021)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование ультраструктурной организации пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Была исследована ультраструктура 4-х культур нейронов: 2-х контрольных (ES5 и iPS12) и 2-х с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* (MA2 и Че3).

ES5 (<29 CAG повторов)

MA2 (47 CAG повторов)



*Рисунок 1. Общий вид средних шипиковых нейронов в контрольной культуре ES5 (слева) и пациент-специфичной культуре MA2 с 47 CAG повторами в гене *HTT* на полутонких срезах (справа). т – тела нейронов; черные головки стрелок указывают на аксоны; белые головки стрелок – на дендриты. Окраска метиленовым синим.*

Нейроны контрольных культур имели треугольное или веретенообразное тело, один аксон и 1-2 дендрита (Рис. 1), содержали светлое округлое ядро с 1-3 небольшими ядрышками (Рис. 2, а). Наблюдались шипики на дендритах (Рис. 2, б, в) и синапсopodobные структуры (Рис. 2, г). В цитоплазме выявлялись тельца Ниссля (Рис. 2, д), представляющие собой стопки шероховатого ЭПР, присутствовали нейрофиламенты толщиной около 10 нм, как отдельно лежащие, так и собранные в пучки (Рис. 2, е).

Рисунок 2.

Ультраструктурная организация контрольных шипиковых нейронов в культуре ES5. а – общий вид нейрона (Я-ядро); б, в – дендриты с шипиками (указаны стрелками); г – синапсоподобная структура; д – тельце Ниссля (обведено пунктиром); е – нейрофиламенты (стрелки) в цитоплазме

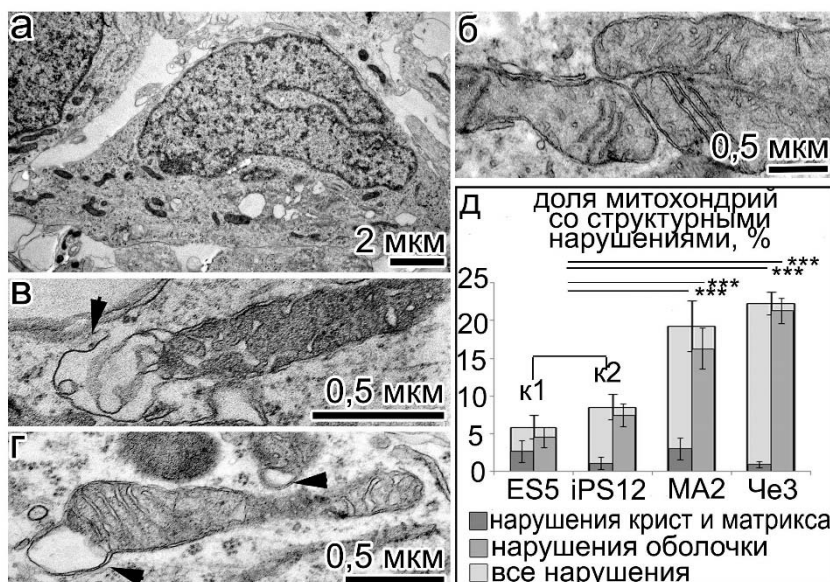
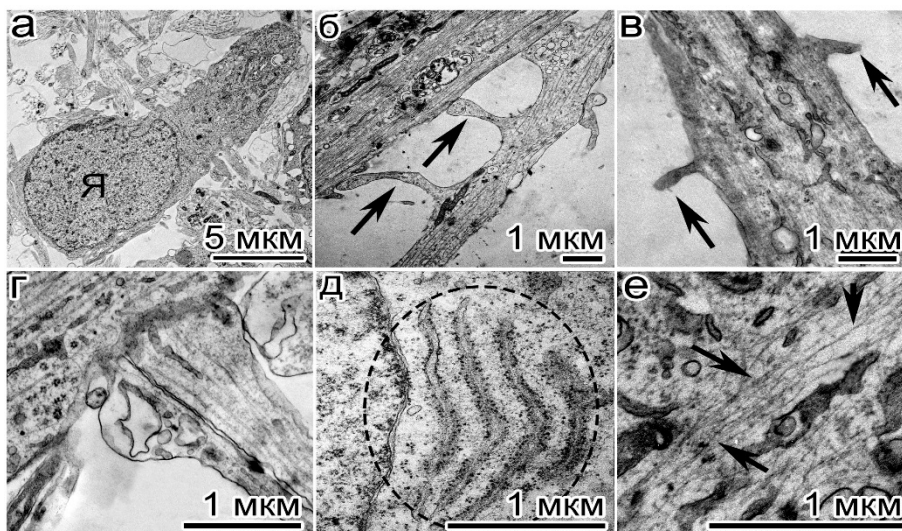
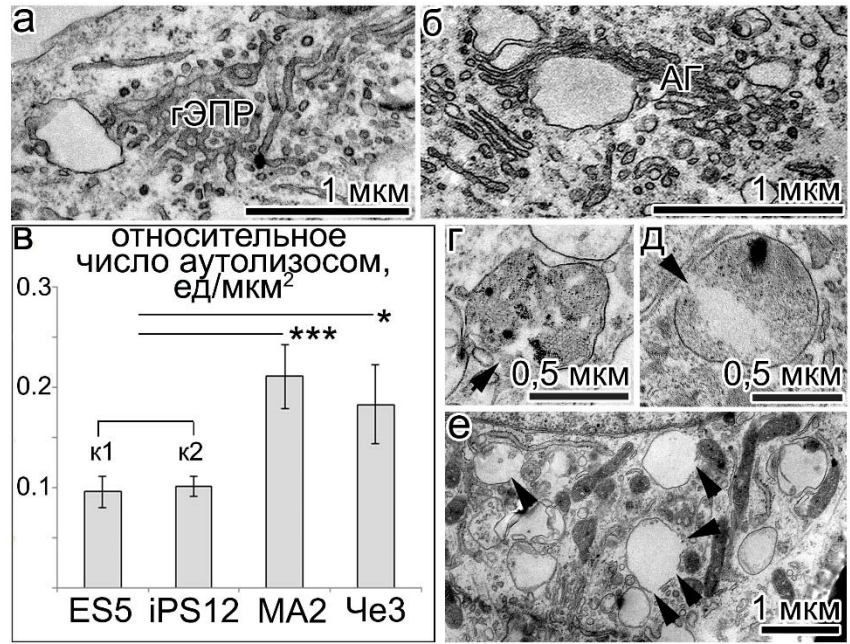


Рисунок 3. Нарушение ультраструктурной организации СШН в пациент-специфичных культурах MA2 и Че3. а – общий вид клетки, видно ядро с инвагинациями оболочки; б-г – дефектные митохондрии с участками разреженного матрикса (б) и выпячиваниями оболочки (в, г, головки стрелок); д – доля дефектных митохондрий с нарушением строения. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку, ***- $p < 0,001$.

Пациент-специфичные нейроны в культурах MA2 и Че3 с увеличенным числом САG повторов имели схожую с контрольными общую морфологию клетки (Рис. 1, б), содержали ядра с инвагинациями оболочки (Рис. 3, а). Митохондрии часто имели разреженные участки в матриксе (Рис. 3, б), нарушенную ориентацию крист, а также выпячивания и разрывы оболочки (Рис. 3, в, г). Их процент увеличивался в 3 раза по сравнению с контролем (Рис. 3, д). Цитоплазма содержала большое количество коротких цистерн шероховатого и гладкого ЭПР, окруженных множеством везикул (Рис. 4, а). Стопки АГ состояли из узких диктиосом, в которых иногда наблюдались расширенные участки (Рис. 4, б). В цитоплазме присутствовало в 2 раза больше аутолизосом по сравнению с контролем (Рис. 4, в, г, д). Кроме того, аутолизосомы, а также крупные светлые вакуоли имели нарушения целостности оболочки (Рис. 4, е).

Рисунок 4.

Особенности ультраструктурной организации пациент-специфичных средних шипиковых нейронов. а – цистерны гладкого ЭПР (гЭПР), окруженные мелкими везикулами; б – стопки АГ с отдельными расширенными диктиосомами; в – численная плотность аутолизосом в пациент-специфичных средних шипиковых нейронах; аутолизосомы (г, д) и крупные светлые вакуоли (е) с нарушением целостности оболочки (головки стрелок).



Оценка влияния EVP4593 на структуру нейронов в пациент-специфичных культурах. Согласно литературным данным (Consortium 2012) и транскриптомному анализу, проведенному нашими коллегами (Nekrasov et al., 2016), в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* изменена экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию гомеостаза кальция, а электрофизиологическое исследование показало повышенный уровень транспорта кальция через депо-управляемые каналы (Nekrasov et al., 2016). Поэтому было решено протестировать влияние на строение мутантных клеток ингибитора депо-управляемых кальциевых каналов EVP4593.

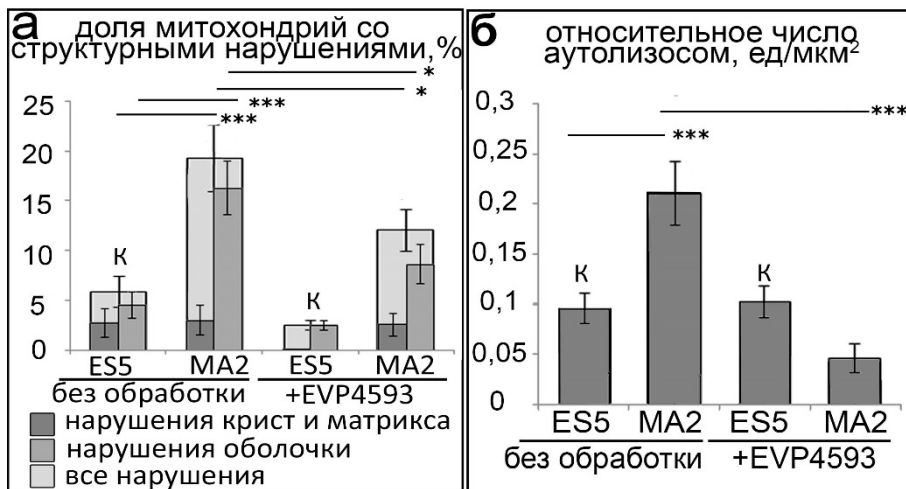


Рисунок 5. Изменение морфометрических параметров митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах MA2 после обработки их EVP4593. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку, *- $p < 0,05$, ***- $p < 0,001$.

Электронно-микроскопический анализ показал, что в пациент-специфичных нейронах после обработки EVP4593 реже встречались клетки с инвагинациями ядер, уменьшалась везикуляция ЭПР и расширение диктиосом АГ. Морфометрический анализ также продемонстрировал достоверное

снижение процента дефектных митохондрий (Рис. 5, а) и относительного числа аутолизосом (Рис. 5, б). Таким образом, отмечено, что нарушение тока кальция в нейронах негативно влияет на организацию внутриклеточных структур, а его регулирование заметно улучшает морфологию клеток и таких органелл, как митохондрии и аутолизосомы.

Исследование ультраструктурной организации генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*. Строение нейронов контрольных культур iMA1L и r2LF имело схожие черты. Это были нейроны с треугольным или веретенообразным телом, одним аксоном и 1-2 дендритами, светлыми округлыми ядрами с 1-3 небольшими ядрышками.

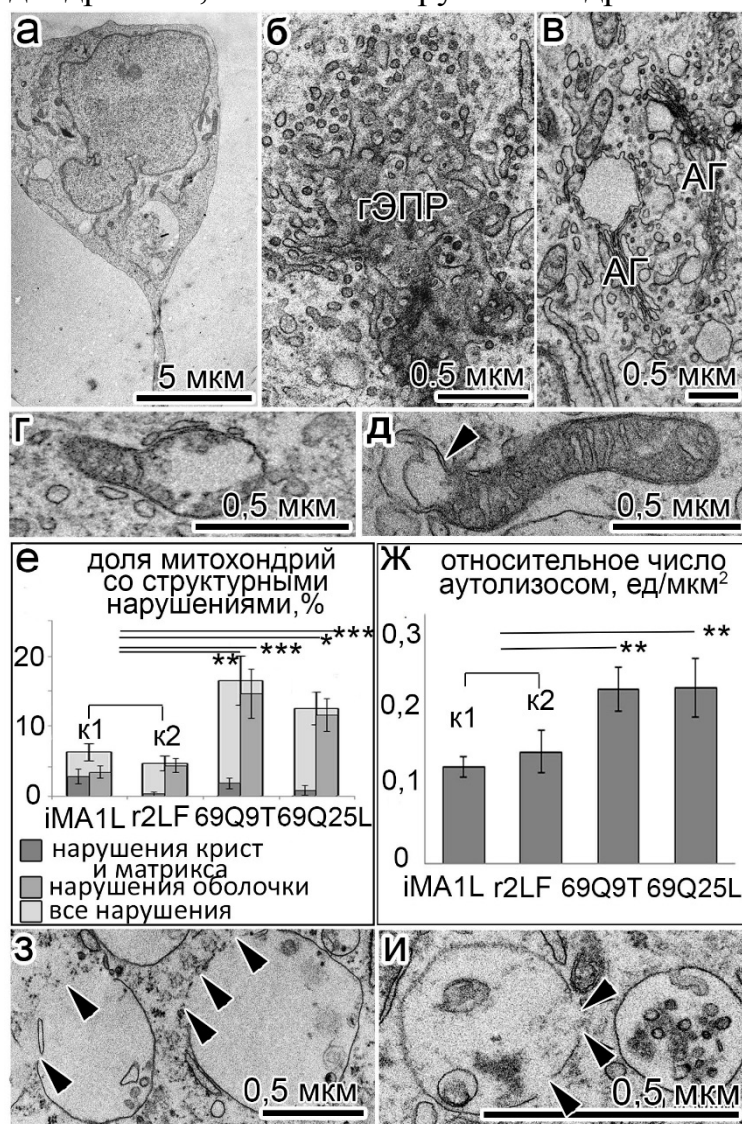


Рисунок 6. Нарушение ультраструктурной организации в генетически модифицированных нейронах 69Q9T с 69 CAG повторами в гене *HTT*. а – общий вид клетки, б – цистерны ЭПР (гЭПР) со множеством везикул; в – АГ с узкими и расширенными диктиосомами; г, д – митохондрии с разреженным матриксом и дефектами оболочки (головка стрелки); е – доля дефектных митохондрий; ж – численная плотность аутолизосом; з, и – крупные вакуоли и аутолизосомы с дефектами оболочки (указаны головками стрелок). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$. ***, $p < 0,001$.

Структурные нарушения в нейронах с 69 CAG повторами в гене *HTT* были схожи с наблюдавшимися в пациент-специфичных нейронах (Рис. 6). Клетки часто имели инвагинации ядерной оболочки (Рис. 6, а). Мембраны шероховатого ЭПР и диктиосомы АГ были окружены множеством мелких везикул

(Рис. 6, б, в), что не наблюдалось в контроле. Доля дефектных митохондрий с нарушенной структурой (Рис. 6, г, д) была в 2 – 3 раза выше, чем в контроле (Рис. 6, е). Численная плотность аутолизосом также возрастала (Рис. 6, ж-и), кроме того, дефекты оболочки наблюдались у более мелких аутолизосом, чем в пациент-специфичных клетках. В культурах генетически модифицированных

нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* около 10% клеток накапливали в цитоплазме крупные плотные аутолизосомы или остаточные тельца (Рис. 7, а) и около 4% клеток были почти полностью заполнены крупными светлыми вакуолями (Рис. 7, б). Можно предположить, что это гибнущие клетки. 16% клеток составляли нейроны с дефектными дендритами с высокой плотностью расположения шипиков (Рис. 7, в).

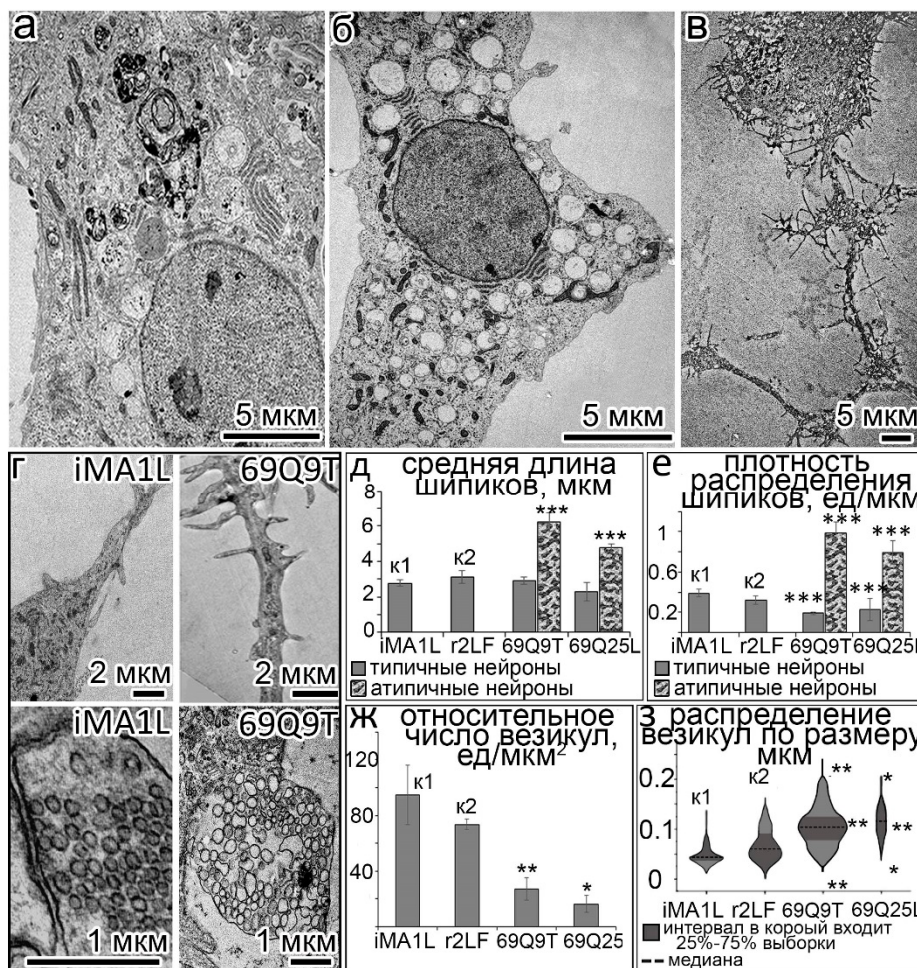


Рисунок 7. Ультраструктурные нарушения в генетически модифицированных нейронах с 69 CAG повторами в гене *HTT*. а, б – нейроны с типичной морфологией, содержащие множество плотных аутофagosом и остаточных телец (а) или светлых вакуолей (б); в – нейроны с дефектными дендритами и шипиками; г – сравнение морфологии шипиков (вверху) и синапсов (внизу) в контрольной культуре *iMAIL* и *69Q9T* с 69 CAG повторами в гене *HTT*; д – увеличение средней длины шипиков у атипичных нейронов; е –

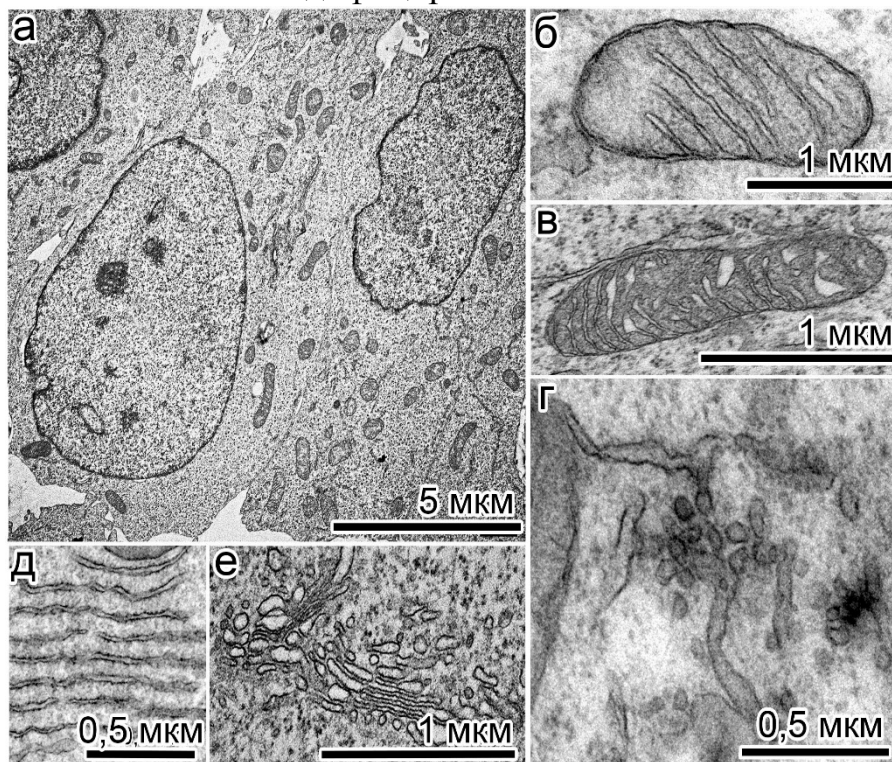
увеличение плотности расположения шипиков у атипичных нейронов; е – уменьшение численной плотности синаптических везикул в нейронах с 69 CAG повторами в гене *HTT*; ж – рост гетерогенности по размеру синаптических везикул в нейронах с 69 CAG повторами в гене *HTT*. *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$.

Морфометрический анализ показал, что у «типичных» нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* длина шипиков не менялась по сравнению с контрольными (Рис. 7, д), а плотность их расположения на дендрите снижалась, тогда как у «атипичных» нейронов возрастала и длина, и плотность расположения шипиков (Рис. 7, д, е). Было также установлено, что в синаптических окончаниях нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* везикулы лежали разрозненно (Рис. 7, г, ж) и существенно отличались по размеру (Рис. 7, г, з), что не типично для синапсов в контрольных нейронах.

Исследование ультраструктурной организации клеток НЕК293 со 150 САG повторами в гене *HTT*. Создание нейрональной клеточной модели с большим числом САG повторов в гене *HTT* является технически очень сложной задачей. Поэтому, для исследования влияния длинного полиглутаминового тракта в гене *HTT* на ультраструктуру клеток, нашими коллегами было предложено использовать генетически модифицированные клетки НЕК293.

Рисунок 8.

Ультраструктурная характеристика клеток НЕК293 исходных контрольных линий НЕК293 Phoenix и FT. а – общий вид клеток; б, в – митохондрии со светлым матриксом и узкими кристами (б) и плотным матриксом и расширенными кристами (в); г – цистерны гладкого ЭПР с небольшим количеством везикул; д – цистерны шероховатого ЭПР; е – два аппарата Гольджи.



Клетки исходных линий НЕК293 Phoenix и НЕК293 FT имели схожую морфологию, содержали крупные ядра с несколькими ядрышками (Рис. 8, а). Цитоплазма клеток была обогащена полисомами, митохондриями со светлым матриксом и узкими кристами (Рис. 8, б) или с плотным матриксом и расширенными кристами (Рис. 8, в), мембранами гладкого (Рис. 8, г) и шероховатого ЭПР (Рис. 8, д). АГ состоял из узких диктиосом (Рис. 8, е).

На основе линии НЕК293 Phoenix был получен клон 6Н, а из линии НЕК293 FT - клон F1, несущие встройку 100-150 САG повторов в гене *HTT*. Клетки этих клонов характеризовались более высокой плотностью органелл в цитоплазме (Рис. 9, а), чем клетки контрольных линий. Везикуляция ЭПР, отмеченная нами в нейронах с увеличенным числом САG повторов в гене *HTT*, также наблюдалась и в клетках клонов НЕК293 6Н и F1. Многие митохондрии демонстрировали изменения формы и ориентации крист, разреженные области матрикса, лишённые крист, и выпячивания оболочки (Рис. 9, в, г). В обеих линиях со встройками достоверно увеличивалась доля митохондрий с нарушенной организацией (Рис. 9, д) и относительное число аутолизосом (Рис. 9, е, ж). Более мелкие, чем в нейронах, плотные и светлые аутолизосомы часто

встречались в цитоплазме, у многих из них была нарушена целостность мембраны (Рис. 9, з, и).

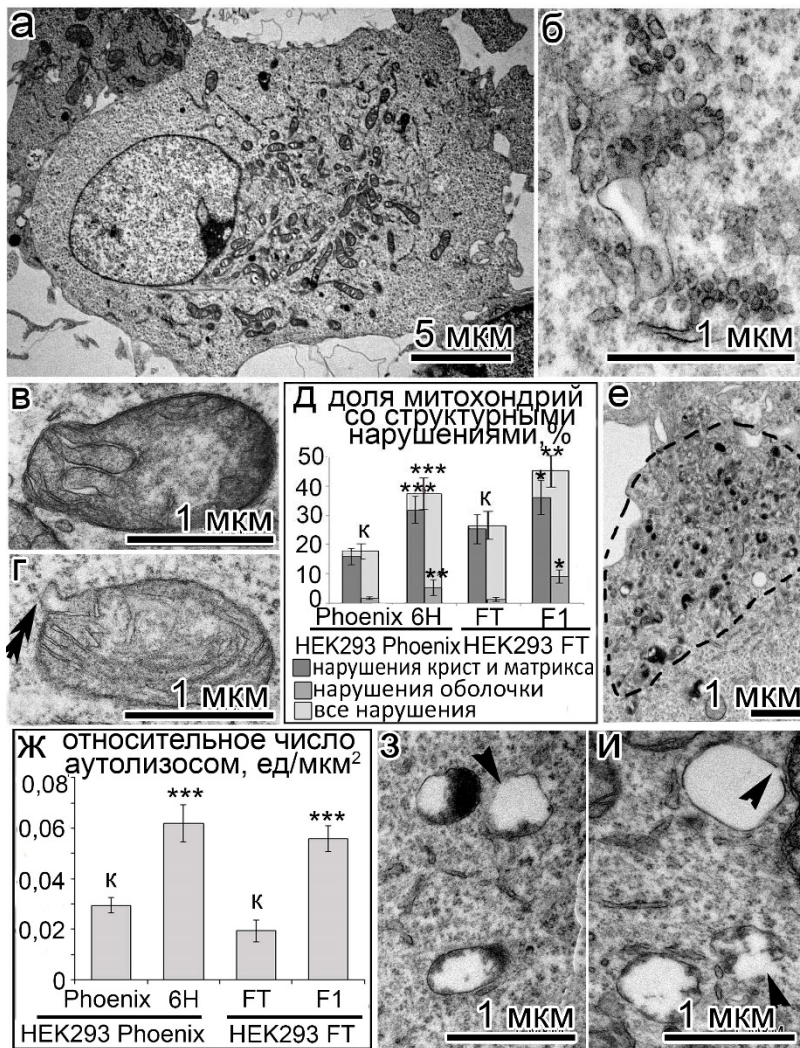
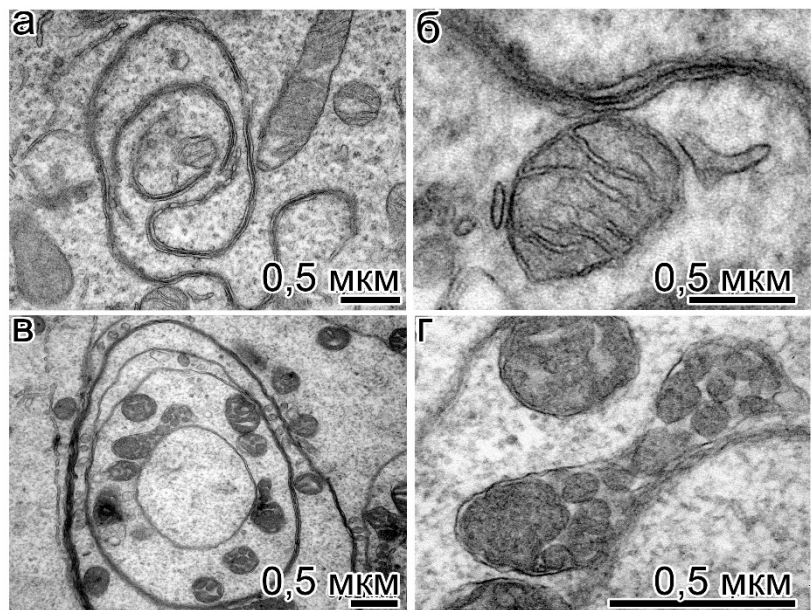


Рисунок 9. Нарушения ультраструктуры клеток HEK293 клонов 6Н и F1 со 100-150 CAG повторами в гене HTT. а – общий вид клетки с цитоплазмой, обогащенной органеллами; б – скопление мембран ЭПР с везикулами; в – митохондрия с деформированными кристами и областью, лишенной крист; г – митохондрия с выпячиванием оболочки (двойная головка стрелки); д - процент митохондрий с дефектами структуры увеличивается в клонах 6Н и F1 со 100-150 повторами в гене HTT; е – мелкие плотные и светлые аутолизосомы образуют скопления в дистальных отделах клетки (обведено пунктиром); ж – количество аутолизосом на единицу площади цитоплазмы возрастает в клонах 6Н и F1 со 100-150 повторами в гене HTT; з, и – мелкие светлые аутолизосомы имеют разрывы оболочки (указано головками стрелок).

Рисунок 10. 4-х слойные структуры ЭПР в клетках клона F1 линии HEK293 FT со 100-150 CAG повторами в гене HTT. а- в, 4-х слойные мембраны ЭПР в цитоплазме клеток; стрелкой указан участок слипания двух мембран ЭПР; б -г контакты митохондрий с 4-х слойными мембранами; г – деградирующая митохондрия, с плотными сферическими кристами



Характерной особенностью клеток клона F1 линии НЕК293 FT являлось присутствие в цитоплазме 4-х слойных мембранных структур, образованных слипанием мембран шероховатого ЭПР между собой (Рис. 10, а, в). На отдельных участках мембран были видны рибосомы и встроенные окончатые мембраны (Рис. 10, а). Наблюдались контакты митохондрий с мембранами этих структур (Рис. 10, б). Митохондрии в цитоплазме часто были расположены внутри многослойных мембран и имели плотные округлые кристы (Рис. 10, г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сходство морфологических дефектов в нейронах с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*. Проведенное нами сравнительное исследование морфологии нейронов с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*, включая пациент-специфичные нейроны (42 и 47 САГ повторов) и генетически модифицированные нейроны (69 САГ повторов), выявило схожие дефекты в ультраструктурной организации компонентов трёх важных клеточных систем: ЭПР, митохондрий и аутолизосом.

Стресс ЭПР в нейронах с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*. Наши исследования показали, что в цитоплазме таких клеток наблюдается более существенное, чем в норме, накопление везикул размером около 30 нм вблизи цистерн ЭПР. Это позволяет предполагать, что транспорт синтезируемых в ЭПР белков, липидов и фосфолипидов нарушен. Как показали многие исследования, мутация в гене *HTT* затрудняет взаимодействие Htt с белками-партнерами (Shirasaki et al., 2012), которые опосредуют его связь с элементами цитоскелета (Li, Li 2005; Cavisto, Holzbaur 2009), в результате чего везикулярный транспорт в цитоплазме нейронов нарушается (Brandstaetter et al. 2014; Caballero 2011). Известно, что экспрессия mHtt нарушает транспорт везикул между ЭПР и АГ (Brandstaetter et al., 2014) и далее от АГ (Gauthier et al. 2004), а также снижает аксональный транспорт и перемещение митохондрий в нейронах (Gauthier et al., 2004; Li, et al., 2010).

Особенности дефектов структурной организации митохондрий в нейронах с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*. Функциональное состояние митохондрий особенно важно для жизнедеятельности нервных клеток, поскольку они обеспечивают производство энергии, участвуют в регуляции гомеостаза Ca^{2+} , а также вовлечены в процессы клеточного стресса, апоптоза и некроза (McBride et al., 2006). Особое значение при нейродегенеративных заболеваниях имеют контакты ЭПР с митохондриями, поскольку они выполняют важную роль в делении митохондрий, гомеостазе Ca^{2+} и апоптозе (MartINVAL et al. 2018; Ghemrawi, 2020). Проведенное нами исследование показало, что как в пациент-специфичных, так и в генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT* выявляется нарушение регулярности расположения и формы крист, разрежение матрикса и

деформация оболочки митохондрий. Аналогичные дегенеративные изменения в структуре митохондрий были описаны ранее при изучении биоптатов головного мозга пациентов с БХ (Tellez-Nagel et al., 1974), пациент-специфичных фибробластов и миобластов (Squitieri et al., 2010), посмертных срезов клеток головного мозга пациентов (Roos and Bots 1983) а также клеток мозга трансгенных мышей со 150 CAG повторами в гене *HTT* (Bayram-weston et al., 2012). Не исключено, что нарушение морфологии митохондрий, наблюдаемое нами, вызвано повреждающим действием активных форм кислорода (АФК), увеличение концентрации которых в клетках при БХ было ранее описано во многих работах (Cui et al., 2006; Stack et al., 2008; Lim et al., 2008) Мы обнаружили увеличение частоты контактов дефектных митохондрий с мембранами ЭПР в клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Можно предполагать, что это связано с дисфункцией митохондриально-ассоциированных мембран ЭПР (МАМ) (Filadi et al., 2017; Vallese et al., 2020). Ещё одной из возможных причин наблюдаемого нами увеличения количества митохондрий со структурными дефектами может быть нарушение процесса удаления поврежденных митохондрий из клеток с помощью особого типа аутофагии – митофагии.

Рост числа и дефектов аутолизосом в клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Наши результаты о росте количества аутолизосом в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* согласуются с данными о накоплении аутофагосоми- и аутолизосомо-подобных структур в цитоплазме нейронов стриатума мышей, трансфецированных плазмидами, несущими ген *HTT* с 46 и 100 CAG повторами (Kegel et al. 2000), а также в миоблестах и фиброблестах пациентов с 42-46 повторами в гене *HTT* (Squitieri et al. 2010). Мы наблюдали присутствие крупных, размером 0,8 – 1,5 мкм, светлых вакуолеподобных структур со скудным содержимым. Ранее присутствие подобных структур было описано в работе Мартинес-Висенте с соавт. (2010), объяснявших это снижением эффективности поглощения клеточных компонентов аутофагической системой. Во всех исследованных нами клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* наблюдались нарушения целостности мембран аутолизосом. В литературе это явление описано как пермеабиллизация мембран лизосом (ПМЛ), приводящая к выходу в цитоплазму интрализосомальных компонентов, таких как катепсины, что приводит к гибели клеток (Wang, Boya, 2018). Возникновение ПМЛ может быть следствием изменения белкового и липидного состава лизосомальной мембраны. Известно, что при мутации в гене *HTT* действительно нарушен синтез холестерина, что было показано как на клеточных моделях грызунов, так и на биоптатах пациентов с БХ (Block et al. 2010).

Уменьшение числа шипиков на дендритах нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Причиной нейродегенеративных

заболеваний является не только непосредственная гибель нейронов, но и уменьшение количества шипиков на дендритах, что приводит к нарушению синаптической передачи (Herms and Dorostkar, 2016). Мы зарегистрировали уменьшение количества шипиков на дендритах большинства пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронов с увеличенным числом CAG повторов. Показано, что нарушение строения и уменьшение количества шипиков может быть вызвано дисбалансом кальция в нервных клетках (Wu et al., 2016). При экспериментальной стимуляции выхода кальция из кальциевого депо ЭПР в нейронах гиппокампа была зарегистрирована деполимеризация микротрубочек в шипиках, приводящая к деградации последних (Pchitskaya et al. 2022). Согласно данным наших коллег, в анализируемых нами пациент-специфичных нейронах был зафиксирован увеличенный ток кальция через депо-управляемые кальциевые каналы (Nekrasov et al. 2016), что может запускать тот же механизм.

Улучшение морфологии нейронов при инкубации с ингибитором кальциевых каналов. Один из основных сигнальных путей Ca^{2+} , депо-управляемый вход Ca^{2+} (Store-Operated Ca^{2+} Entry – SOCE), значительно повышен при БХ (Zhang et al. 2015). Нашими коллегами из ИОГен РАН на пациент-специфичных нейронах культур MA2 с 47 CAG повторами в гене *HTT* было продемонстрировано усиление этого тока (Nekrasov et al. 2016). Фармакологическое ингибирование SOCE может быть потенциальным способом борьбы с нейродегенерацией (Wu et al. 2011). В своей работе мы впервые исследовали ультраструктуру пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами, проинкубированных с ингибитором депо-управляемых кальциевых каналов EVP4593 (Nekrasov et al., 2016). Зарегистрированное нами уменьшение количества аутолизосом и снижение частоты структурных нарушений митохондрий могут свидетельствовать о значительном влиянии повышенной концентрации кальция на нарушения морфологии органелл и восстановлении их функционирования при нормализации концентрации кальция в клетке.

Особенности дефектов ультраструктурной организации нейронов и клеток НЕК293, сопутствующие увеличению числа CAG повторов в гене *HTT*. Использование трёх различных клеточных моделей отличающихся увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* позволило нам провести сравнительный анализ и выявить не только сходство морфологических нарушений, характерных для клеток с данной мутацией, но и продемонстрировать различия патологических проявлений, коррелирующих с ростом количества этих повторов.

Гибель и деградация клеток в культурах генетически модифицированных нейронов. В популяции нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* нами наблюдались клетки, накапливающие большое количество как

плотных, так и светлых аутолизосом, что не наблюдалось в культурах пациент-специфичных нейронов с 42 и 47 САГ повторами. Ранее была описана корреляция накопления крупных аутолизосом и вакуолей в цитоплазме клеток с их последующей гибелью путём программируемого некроза (Mao et al. 2016). Таким образом, нейроны с большим скоплением подобных структур в цитоплазме, можно отнести к потенциально гибнущим. Впервые в культуре генетически модифицированных нейронов с 69 САГ повторами нами были обнаружены атипичные нейроны с многочисленными тонкими длинными дендритами и гипертрофированными шипиками различного размера с повышенной плотностью их расположения по длине дендрита. Ранее, ветвление и увеличение средней длины шипиков было отмечено авторами, исследовавшими строение нейронов с увеличенным числом САГ повторов в гиппокампе мышей (Bulley et al. 2012). Согласно предположению авторов, эти изменения связаны с заменой функционально зрелых шипиков на менее зрелые и менее стабильные. Выявленные нами дегенеративные изменения, затрагивающие функциональную организацию компонентов нейрона, непосредственно участвующих в передаче нервных сигналов, наравне с регистрируемой гибелью нейронов, по-видимому, обуславливают последующую деградацию нервной ткани при БХ.

Формирование атипичных многослойных мембран шероховатого ЭПР в клетках НЕК293 со 100-150 САГ повторами в гене *HTT*. В клетках клона F1 линии НЕК293 FT нами впервые были обнаружены 4-х слойные мембраны, формирующиеся при слипании 2-х цистерн шероховатого ЭПР. Схожие структуры ЭПР в цитоплазме были выявлены в клетках дрожжей с нарушенным синтезом мембранных фосфолипидов вследствие делеции дрожжевого гомолога белка липина РАН1 или его регуляторов, (Santos-Rosa et al. 2005; Tange et al., 2002), функция которых в настоящее время активно исследуется (Fan et al., 2018; Schweitzer et al., 2019; Cascalho et al., 2020). Эти наблюдения согласуются с данными о нарушении липидного состава в клетках мозга пациентов при БХ, (Block et al., 2010). Связь между *mHtt* и обменом липидов может быть действительно опосредована липином через *mTOR* (Peterson et al., 2011), однако механизм этого процесса пока не совсем ясен и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с использованием высокоразрешающей электронной микроскопии и морфометрического анализа мы исследовали морфологию клеток 3-х культур с разным увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*, а именно, СШН, дифференцированных из ИПСК пациентов с БХ (42 и 47 САГ повторов), а также генетически модифицированных СШН (69 САГ повторов) и клеток НЕК293 с трансгенной встройкой САГ повторов (100-150) в ген *HTT*. Сравнительный анализ нейронов показал, что, несмотря на различное

происхождение этих клеток и количество CAG повторов в гене *HTT*, они имеют ряд схожих нарушений морфологии внутриклеточных структур. Они включали усиленную везикуляцию цистерн шероховатого и гладкого ЭПР; дефекты оболочки, матрикса и крист митохондрий; нарушение целостности мембран аутолизосом и увеличение их количества в цитоплазме. Нейроны с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* характеризовались также снижением частоты расположения шипиков на дендритах.

Впервые выявлены дополнительные нарушения морфологии нейронов, коррелирующие с увеличением числа CAG повторов в гене *HTT*. Так, в культуре генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*, по сравнению с пациент-специфичными нейронами с 42-47 CAG повторами, увеличивалось число гибнущих клеток и нейронов с дефектами строения дендритов, шипиков и синапсов, что должно вызывать нарушение передачи нервных импульсов и дегенерацию нервной ткани. В клетках НЕК293 со 100-150 CAG повторами в гене *HTT* наблюдалось слипание цистерн шероховатого ЭПР, что может свидетельствовать о нарушении состава фосфолипидов и, соответственно, свойств клеточных мембран, коррелирующее с высоким числом CAG повторов в гене *HTT*.

Впервые нами было продемонстрировано улучшение морфологии пациент-специфичных СШН после их инкубации с ингибитором депо-зависимых кальциевых каналов EVR4593, что ещё раз указывает на важную роль нарушения кальциевого гомеостаза в патогенезе БХ.

ВЫВОДЫ

1. Нейроны пациент-специфичных и генетически модифицированных культур, содержащие увеличенное число CAG повторов (42-47, и 69, соответственно) в гене *HTT*, а также генетически модифицированные клетки НЕК293, содержащие 100-150 CAG повторов, имеют схожие патологические изменения гладкого и шероховатого ЭПР (накопление мелких везикул вблизи цистерн), митохондрий (нарушение оболочки, деформация крист и разрежение матрикса), и аутолизосом (нарушение целостности окружающей мембраны).
2. Впервые продемонстрировано присутствие в популяции нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* атипичных нейронов с дефектной организацией дендритов, шипиков и синапсов, а также гибнущих нейронов, не наблюдавшихся в пациент-специфичных культурах с 42-47 CAG повторами. Это свидетельствует о связи между ростом числа CAG повторов в гене *HTT* и увеличением степени патологического действия мутантного белка Htt на функциональную организацию компонентов нейронов, участвующих в передаче нервного сигнала.
3. Генетически модифицированные клетки НЕК293 со 100-150 CAG повторами в гене *HTT* характеризуются присутствием в цитоплазме четырёхслойных мембранных структур, формирующихся при атипичном взаимном слипании

двух цистерн шероховатого ЭПР, что может свидетельствовать о нарушении свойств фосфолипидов, входящих в состав этих мембран.

4. Ингибирование депо-зависимых кальциевых каналов с использованием EVR4593 приводит к снижению частоты встречаемости митохондрий со структурными нарушениями, снижает количество аутолизосом в пациент-специфичных нейронах с 47 CAG повторами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vasina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Kostrjukova E.S., Kiseleva E., Suldina L.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Yu., Illarioshkin S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // *Molecular Neurodegeneration* – 2016. – Vol. 11. - № 1. – P. 1-15.

2. Suldina L.A.*, Morozova K.N.*, 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. * - равный вклад авторов.

3. Morozova K.N., Suldina L.A., Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/Cas9 technology // *Genes and Cells*. – 2018. – Vol. 2. – № 77.

4. Malankhanova T., Suldina L., Grigor'eva E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakiyan S., Malakhova A. Human induced pluripotent stem cell-derived isogenic model of Huntington's disease based on neuronal cells has several relevant phenotypic abnormalities // *Journal of Personalized Medicine*. – 2020. – Vol. 10. – № 4. – P. 215.

5. Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A., Pavlova S.V., Minina J.M., Kizilova E.A., Suldina L.A., Morozova K.N., Kiseleva E., Sorokoumov E.D., Lebedev I.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. – 2020. – Vol. 72. – P. 649-663.

6. Suldina L.A., Morozova K.N., Malankhanova T.B., Malakhova A.A., Kiseleva E. Electron microscopic analysis of autophagy in neurons with expanded CAG repeats in the huntingtin gene in patient-specific and transgenic cell model. *Cell Death Discovery*. - 2021. – Vol. 7. – P. 1–14.