

УДК 611/612

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Муслимова Э.Р., Карабаш З.С., Юнси Г.А.

Аннотация. До недавнего времени клеточная биология нейродегенеративных заболеваний с трудом поддавалась изучению, но с открытием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) стало возможным создание моделей заболеваний на основе соматических клеток. Со временем были усовершенствованы методы по повышению эффективности перепрограммирования, таким образом были открыты невирусные векторы как один из методов перепрограммирования, а также использованы совершенно новые методы редактирования генома, что сделало возможным создание генетически исправленных линий из ИПСК, полученные от исследуемого пациента. В этой работе были проанализированы открытия и достижения, которые были сделаны с использованием моделей ИПСК для дальнейшего изучения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Хантингтона и боковой амиотрофической склероз. Также были рассмотрены основные принципы для создания моделей ИПСК. Благодаря моделированию были выявлены фенотипы нейродегенеративных заболеваний, которые для лучшего изучения были подвержены действию характерных критических факторов, таких как стресс и клеточное старение. Помимо этого были рассмотрены вопросы дальнейшей перспективы использования моделей нейродегенеративных заболеваний на основе ИПСК, например, в скрининге ИПСК-линий для дальнейшего создания и тестирования терапевтических лекарственных средств или клеточной терапии. А также возможно внедрение в медицинскую практику клеточной трансплантации для лечения этих расстройств. Таким образом, изучение и создание моделей дает нам возможность в полной мере понять патогенез этих болезней, что значительно облегчит исследование и разработку новых терапевтических средств.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофической склероз, нейродегенеративные заболевания.

Abstract. Until recently, cell biology of neurodegenerative diseases was difficult to study, but with the discovery of induced pluripotent stem cells (iPSC), it became possible to create models of diseases based on somatic cells. Over time, methods to improve the efficiency of reprogramming were improved, thus non-viral vectors were discovered as one of the reprogramming methods, and completely new genome editing methods were used, which made it possible to create genetically corrected iPSC lines obtained from the patient under study. In this work, discoveries and advances that were made using iPSC models to further study neurodegenerative diseases such as Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis were analyzed. The basic principles for creating iPSC models were also considered. Through modeling, phenotypes of neurodegenerative diseases were identified, which, for a better study, were exposed to characteristic critical factors, such as stress and cellular aging. In addition, questions were considered on the further prospects of using models of neurodegenerative diseases based on iPSCs, for example, in screening iPSCs for further development and testing of therapeutic drugs or cell therapy. And it is also possible to introduce cell transplantation into medical practice for the treatment of these disorders. Thus, the study and creation of models allows us to fully understand the pathogenesis of these diseases, which will greatly facilitate the research and development of new therapeutic agents.

Key words: Induced Pluripotent Stem Cells, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative disease.

Создание моделей ИПСК для лечения нейродегенеративных заболеваний. Существует множество подходов к созданию стволовых клеток для исследования заболеваний мозга. В этом обзоре мы обсудим индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Способность генерировать плюрипотентные стволовые клетки из взрослых полностью дифференцированных клеток, таких как фибробласты кожи, была крупным достижением в медицине в последние годы. Истинная плюрипотентность ИПСК была продемонстрирована успешным производством жизнеспособных мышей из ИПСК с использованием тетраплоидной комплементации. Озабоченность сохранением векторов перепрограммирования в хромосомной ДНК была смягчена разработкой методов перепрограммирования без интеграции вирусных векторов. Демонстрация того, что ИПСК

могут быть получены от пациентов, открыла эру изучения фенотипов клеточных заболеваний в моделях клеток, полученных пациентами. ИПСК могут быть получены от пациентов пожилого возраста, что указывает на их полезность для таких поздних заболеваний, как нейродегенеративные заболевания. ИПСК, полученные от донора, несущего мутацию в гене риска заболевания, могут быть генетически скорректированы с использованием гомологичной рекомбинации, ZFN, TALEN или CRISPR / Cas9. Полученные в результате изогенные клетки могут использоваться в качестве нормального контроля или, возможно, для терапии трансплантации клеток. Эти методы могут также использоваться для введения мутаций, связанных с болезнью, в геномы здоровых донорских ИПСК. Генетически модифицированные клетки и родительские ИПСК могут быть дифференцированы в нейронные стволовые клетки (предшественников) (НСК). НСК могут быть размножены, отсортированы для соответствующих нейронных предшественников и дополнительно дифференцированы в зрелые специфические к ней неврологические подтипы. Для исследования нервных дегенеративных расстройств стрессоры клеток или старение искусственных клеток могут применяться для усиления фенотипов, специфичных для болезни. Клетки могут использоваться для скрининга соединений для обнаружения лекарств и тестирования новых терапевтических средств. Плюрипотентные стволовые клетки человека также могут быть дифференцированы *in vitro* в предшественники астроглиальных и олигодендроцитов, способные к дальнейшей дифференциации в зрелые астроциты и олигодендроциты *in vivo*. Возможности изучения генетических нейродегенеративных заболеваний также значительно улучшились современными методами редактирования генома. К ним относятся гомологичная рекомбинация и более современные и эффективные методы, включающие цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), транскрипционные активатор-подобные эффекторные нуклеазы (TALEN) и высокоэффективный и недорогой метод, называемый CRISPR. Система CRISPR / Cas9 состоит из CRISPR-ассоциированной нуклеазы Cas9 и короткой гидовой РНК (gRNA) для нацеливания на бактериальную двухнитевую ДНК-эндонуклеазу Cas9 на специфическую геномную последовательность. Подход CRISPR / Cas9 подвергся критике из-за побочных эффектов, однако дальнейшие достижения в технике поразительно уменьшили нецелевой мутагенез. Эти методы редактирования генома имеют много потенциальных применений для изучения нейродегенеративных заболеваний, включая коррекцию или генерацию генетических мутаций, а также добавление экспериментальных изменений в клеточные линии с генетическими мутациями, с приложениями для моделирования болезней или потенциально для подходов клеток. Одной из важных проблем моделирования нейродегенеративных патологий на современном этапе является несовершенство и отсутствие необходимых знаний о патогенезе этих заболеваний, а также

наличие большого количества факторов риска такие как различные виды стрессоров (окислительный стресс, дефицит факторов роста, эксайтоксичность и другие), заболевания различных систем организма (заболевания сердечно-сосудистой системы, черепно-мозговые травмы), несоответствующий образ жизни и т.д. ИПСК, полученные от пациентов с болезнью Хантингтона и амиотрофическим боковым склерозом, были успешно дифференцированы в зрелые нейроны с соответствующими свойствами и демонстрируют специфические для болезни фенотипы. Существует множество возможных применений технологии стволовых клеток для исследований нейродегенеративных заболеваний. К ним относятся изучение основных механизмов заболевания, идентификация терапевтических целей и разработка анализов для скрининга, так же могут быть разработаны клетки для трансплантации. Было проведено несколько обзоров применения ИПСК для изучения нейродегенеративных заболеваний. В этой статье мы сосредоточимся на последних достижениях в области ИПСК для понимания патогенеза и применения в терапии.

Болезнь Хантингтона (БХ). Болезнь Хантингтона – генетическое нейродегенеративное расстройство, вызванное умножением кодона CAG в гене НТТ (Huntingtin). Нейроморфологическая картина представлена атрофией стриатума, а именно гибелью срединных шипиковых нейронов, а на поздней стадии и коры головного мозга. Уже существуют модели для дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в фенотип, аналогичный срединным шипиковым нейронам. Национальный институт неврологических расстройств и инсульта, который является одним из институтов здравоохранения США, провел обширную серию исследования клеток, взятых от пациентов с увеличением триплетов CAG(cytosine-adenine-guanine) [1]. Эти ИПСК показали модели генной и белковой экспрессии, отличной от контрольной, в соответствии с функциями, которые изменены при болезни, такими как протеостаз, клеточный транспорт и метаболизм, а также метаболизм РНК. Кроме того, была замечена некая закономерность: клетки с большим количеством повторений триплета имели больше нарушений. После дифференцировки в нейронные линии были выявлены фенотипы, включающие изменения в клеточной адгезии и токсичности, метаболизме, и биоэлектрической активности, опосредованной ионными процессами в синапсах. Клетки с большим количеством увеличений CAG были наиболее уязвимы к изъятию из клеточных сред нейротрофического фактора мозга (BDNF), который стимулирует и поддерживает развитие нейронов. Другими стрессорами, вызванными увеличением триплета, были токсичность глутамата, окислительный стресс и ингибирование аутофагии. В другом исследовании была взята одна линия с увеличенным количеством повторов, но отличалась коррекцией мутации с использованием гомологичной рекомбинации. Для подтверждения плюрипотентности

использовали анализ иммуноцитохимии, который показал экспрессию классических маркеров плюрипотентности: Nanog, Sox2, Oct4, SSEA4, и TRA-1-60. Основной целью было установить, приводит ли генетическая коррекция к изменению ранее установленных фенотипов БХ. Было показано, что коррекция сохраняется при дифференцировке ИПСК в нейроны *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, исправление нормализовало активность каспазы, уровни BDNF, биоэнергетику митохондрий, сигнальные пути кадгерина и TGF-beta (Transforming growth factor beta), которые нарушены в генетически неисправленных клетках [2]. Так же были получены ИПСК БХ, у которых наблюдалась значительное увеличение лизосомальной активности, чрезмерная фрагментация митохондрий [3], повышенная активность репрессора транскрипции, блокирующий транскрипционный фактор REST (repressor element-1-silencing transcription factor). Исследователи обнаружили, что P110TAT(селективный ингибитор) тормозит фрагментацию митохондрий. Действительно, лечение им трансгенных мышей показало снижение митохондриальной дисфункции, моторного дефицита, невропатологии и смертности. Возможно, P110-TAT сможет предотвратить или замедлить прогрессирование БХ у человека. Вероятно, БХ влияет не только на нейроны, так как при дифференцировке ИПСК в астроциты появляются признаки клеточной патологии. ИПСК БХ были использованы для исследований в экспериментальной терапии. Используя анализ люциферазы, обнаружили изменение фенотипов в ИПСК БХ [4]. Соединение X5050 (производное энзоимидазола-5-карбоксамиды) увеличивало экспрессию BDNF и нескольких других REST-регулируемых генов в префронтальной коре мышей с индуцированными хинолином стриатальными поражениями. Таким образом, описанные выше исследования показывают потенциал использования ИПСК БХ не только для изучения патогенеза, но и для тестирования в экспериментальной медицине. Так же открывается возможность трансплантации клеток в надежде на замену пораженным. Препараты нейронных предшественников были трансплантированы в крысиную модель БХ с эксайтоксическими стриатальными поражениями. Наблюдалось восстановление поведения, однако у трансплантированных клеток развилась клеточная патология, что указывает на важность коррекции гена перед пересадкой [5].

Боковой амиотрофический склероз (БАС). Синдром бокового амиотрофического склероза является очень удобным для создания моделей с использованием ИПСК, так как существует ряд генетических мутаций, которые вызывают БАС, принадлежащий к группе фронтотемпоральных деменций (ФТД), а также выявлены случаи, вызванные неизвестными мутациями. Вдобавок, на современном этапе развития достаточно хорошо сформированы модели для создания двигательных нейронов, что делает допустимым изучение и

последовательный анализ результатов исследований из разных лабораторий. Серия исследований показала, что заболевания, связанные с нарушениями фенотипа в клетках, были запрограммированы у пациентов с мутациями в TDP-43 (TAR DNA binding protein 43). Таким образом, моторные нейроны характеризовались повышенным уровнем мутантного белка TDP-43 в детергентной форме, вследствие чего выявлено повышение уязвимости к клеточным стрессорам, а также наличие цитозольных агрегатов в этих клетках в соответствии с более ранними сведениями в исследованиях клеток у пациентов с БАС [6]. Следовательно, подобные исследования согласуются с гипотезой о том, что мутации TDP-43 действуют через генетическое усиление функции, эффект которых может быть автономным в клетке. Исследования Наохиро Егавы, направленные на то, чтобы показать возможность применения специфических ИПСК для скрининга лекарств, выявили улучшение клеточного фенотипа [7]. В последующих, более обширных исследованиях были выбраны две-три линии ИПСК от пациентов с мутантным геном, и у здорового члена семьи, после чего была обнаружена повышенная чувствительность к стауроспорину, а также изменения уровня самого TDP-43 и микро-РНК (miR-9) [8]. Около 10% случаев этой болезни наследуются, и БАС-8 является аутосомно-доминантной формой семейного БАС, вызванная мутациями VAMP ассоциированным белком В/С (VAPB) [9]. Белок VAPB участвует во многих клеточных процессах и, вероятнее всего, способствует патогенезу других форм БАС, кроме БАС-8. Таким образом, фибробласты от пациентов с БАС-8 и от незатронутых болезнью членов семьи были перепрограммированы плюрипотентные клетки и дифференцированы до моторных нейронов, и по итогу было выявление понижение уровня белка VAPB. Придя к выводу можно предположить, что оптимальные уровни VAPB могут играть важную роль в механизме зарождения и развития БАС-8. Около 90% случаев БАС не относят к явной генетической наследуемости и характеризуются как спорадические. Из этой группы 20% случаев, связанные с генетическими мутациями, ассоциированы с Cu/Zn-супероксиддисмутазой SOD1 [10]. Выяснено, что этот фермент главным образом обезвреживает свободные радикалы, которые высвобождаются при метаболизме, а именно в митохондриях, при этом играя роль регулятора функций клетки. У животных, у которых были как активные, так и неактивные формы этого фермента проявляли симптомы, сходные с симптомами при БАС, такие как потеря контактов между синапсами моторных нейронов, нарушение митохондриальной активности и активация клеток глии. Опыт на мышах, при котором им вводили мутантный ген SOD1 позволил воспроизвести ключевые симптомы процесса нейродегенерации при БАС. Также этот опыт отразил то, что токсический эффект SOD1 не нарушает ферментативную активность. Тем не менее токсическое действие этого гена на данный момент рассматривается, как основная этимология БАС. Эти опыты

позволили получить ИПСК для пациентов с семейной формой SOD1-ассоциированного с БАС посредством перепрограммирования первичных фибробластов, которые обладали свойствами эмбриональных стволовых клеток, в том числе неограниченной пролиферативной активностью и способностью к дифференцировке во все типы клеток организма, с помощью эктопической экспрессии генов четырех транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4. Полученные линии ИПСК были детально изучены и охарактеризованы, а также были подробно разработаны методики их дифференцировки в моторные нейроны.

Заключение. Таким образом, в данной статье были проанализированы концепции создания моделей для нейродегенеративных заболеваний с помощью ИПСК. Основополагающим для успешного создания модели является выбор контрольных клеток для выявления патологических нарушений. В качестве контрольных клеток обычно используются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), взятые из внутренней клеточной массы бластоцисты спустя 5-6 дней после оплодотворения, или ИПСК от здоровых доноров, не имеющих мутаций в гене риска заболевания, либо генетически исправленные клетки от самого пациента. Затем клетки выращивают в культуре, дифференцировка должна проходить с соответствующими нейронными предшественниками. Важным является последующая трансплантация выращенных клеток в мозг, а так же нужно, чтобы клетки не образовывали опухоли и не вызывали иммунную реакцию. После введения нейроны должны образовывать функциональные связи – синапсы. Это представляет собой сложный, но теоритически достижимый комплекс мероприятий. Интересно, что между моделями разных заболеваний возникают общие черты, такие как нарушения клеточного метаболизма и окислительный стресс. Одной из немаловажных целей является созданием моделей с несколькими типами клеток. Другим подходом в клеточном моделировании может быть использование 3D культур *in vitro* и химерных моделей. Сравнение трансплантированных здоровых и пораженных клеток грызунам может помочь понять клеточные и молекулярные процессы, которые вызывают проявления болезни. В конце концов, независимо от того, возможно ли лечение с помощью пересадки ИПСК, модели заболеваний могут использоваться для идентификации новых терапевтических подходов к лечению, а также для скрининга или тестирования новых терапевтических препаратов.

Список использованных источников:

1. HD iPSC Consortium. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 2012; doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.027.

2. An M.C. Zhang N. Scott G. Montoro D. Wittkop T. Mooney S. Melov S. Ellerby L.M. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells *Cell Stem Cell* 2012; doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.026.
3. Guo X. Disatnik M.H. Monbureau M. Shamloo M. Mochly-Rosen D. Qi X. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration *J. Clin. Invest.* 2013; doi:10.1172/JCI70911.
4. Charbord J. Poydenot P. Bonnefond C. Feyeux M. Casagrande F. Brinon B. Francelle L. Auregan G. Guillermier M. Cailleret M. et al. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes *Stem Cells* 2013; doi.org/10.1002/stem.1430.
5. Jeon I. Lee N. Li J.Y. Park I.H. Park K.S. Moon J. Shim S.H. Choi C. Chang D.J. Kwon J. et al. Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells *Stem Cells* 2012; doi.org/10.1002/stem.1135.
6. Egawa N. Kitaoka S. Tsukita K. Naitoh M. Takahashi K. Yamamoto T. Adachi F. Kondo T. Okita K. Asaka I. et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells *Sci. Transl. Med.* 2012; doi: 10.1126/scitranslmed.3004052
7. Egawa N. Kitaoka S. Tsukita K. Naitoh M. Takahashi K. Yamamoto T. Adachi F. Kondo T. Okita K. Asaka I. et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells *Sci. Transl. Med.* 2012; doi: 10.1126/scitranslmed.3004052
8. Zhang Z. Almeida S. Lu Y. Nishimura A.L. Peng L. Sun D. Wu B. Karydas A.M. Tartaglia M.C. Fong J.C. et al. Downregulation of microRNA-9 in iPSC-derived neurons of FTD/ALS patients with TDP-43 mutations *PloS one* 2013; doi.org/10.1371/journal.pone.0076055.
9. Mitne-Neto M. Machado-Costa M. Marchetto M.C. Bengtson M.H. Joazeiro C.A. Tsuda H. Bellen H.J. Silva H.C. Oliveira A.S. Lazar M. et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients *Hum. Mol. Genet.* 2011; doi.org/10.1093/hmg/ddr284.
10. Chen H. Qian K. Du Z. Cao J. Petersen A. Liu H. Blackbourn L.W.t. Huang C.L. Errigo A. Yin Y. et al. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons *Cell Stem Cell* 2014; doi: 10.5772/62851.

