

УДК 576.5

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА В НЕЙРОНЫ СТРИАТУМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ ПАТОЛОГИИ

© 2024 г. Н. А. Красковская*, М. Г. Хотин,
член-корреспондент РАН А. Н. Томилин, Н. А. Михайлова

Поступило 30.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принято к публикации 04.11.2023 г.

Разработана новая *in vitro* модель болезни Хантингтона (БХ), основанная на прямом репрограммировании дермальных фибробластов пациента с данным генетическим заболеванием в нейроны стриатума. Прямое репрограммирование позволяет получать нейроны, исключая этап репрограммирования в индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки, при котором происходит потеря эпигенетической информации, заложенной в клетках конкретного донора, а следовательно, и возраст-ассоциированный фенотип заболевания. Новая модель воспроизводит основной гистопатологический признак болезни Хантингтона – накопление агрегатов мутантного белка хантингтина в нейронах стриатума, полученных из фибробластов больного. Проведение экспериментов на нейронах пациентов в культуре, полученных при помощи прямого репрограммирования, позволяет индивидуально оценить степень прогрессирования нейропатологии и осуществить персонализированный подход в выборе стратегии лечения и подборе лекарственных препаратов для терапии. Модель болезни Хантингтона *in vitro* может также быть использована для доклинических исследований лекарственных препаратов.

Ключевые слова: прямое репрограммирование, болезнь Хантингтона, нейроны, стриатум, фибробласты, агрегаты белка хантингтина

DOI: 10.31857/S2686738924010131, **EDN:** KPTWVG

Болезнь Хантингтона (БХ) является неизлечимым доминантно-наследуемым генетическим заболеванием человека, вызванным увеличением количества повторов кодона CAG выше порога в 36 триплетов в гене IT15, также известного как ген НТТ, кодирующем белок хантингтин [1]. Средний возраст манифестации составляет 35–45 лет, в зависимости от количества повторов CAG в полиморфном локусе гена. Увеличение количества повторов приводит к удлинению полиглутаминового тракта в белке, что в свою очередь приводит к формированию агрегатов мутантного белка в тканях головного мозга [2]. Большие успехи были достигнуты с применением технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток [3] и нейронов из них [4–6]. Однако iPS клетки имеют ряд недостатков, которые накладывают существенное ограничение на их использование в контексте мо-

делирования нейродегенеративных заболеваний [7]. При переходе через плюрипотентное состояние нейрональные клетки теряют большую часть эпигенетических меток, которые были приобретены в процессе дифференцировки и созревания соматических клеток, из которых они произошли [8]. Кроме того, «зрелость» нейронов, получаемых через iPS клетки, сильно зависит от протокола репрограммирования, который также зачастую трудно воспроизводится [9].

Ряд патологических изменений при развитии нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, проявляется с возрастом, когда нейроны стареют и становятся более уязвимыми к клеточному стрессу [10]. Принимая во внимание этот важный аспект для моделирования БХ, мы сосредоточились на новом подходе к моделированию нейропатологии, основанном на прямом репрограммировании. Ключевым элементом данного подхода является отсутствие этапа дедифференцировки в эмбриональное состояние, прохождение через которое является причиной потери эпигенетической информации из клеток донора. Такой подход позволяет в большей

Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com

степени сохранить возраст-ассоциированный фенотип заболевания [7, 11], и лучше отражает характерный фенотип нейронов (например, гибель этих клеток), в отличие от моделей, в которых отсутствуют эпигенетические маркеры старения. В нейронах, полученных посредством прямого репрограммирования, наблюдается возраст-специфичный профиль транскрипции генов и снижение уровня ядерного транспортного рецептора, чего не наблюдалось в нейронах, полученных через iPS клетки [12]. Кроме того, нейроны, полученные путем прямого репрограммирования, лучше сохраняют признаки старения доноров, включая повреждение ДНК, потерю гетерохроматина и ядерной организации, а также повышенную активность бета-галактозидазы [7].

К настоящему моменту опубликовано всего 4 статьи с применением прямого репрограммирования для изучения патогенеза БХ [11, 13–15], что

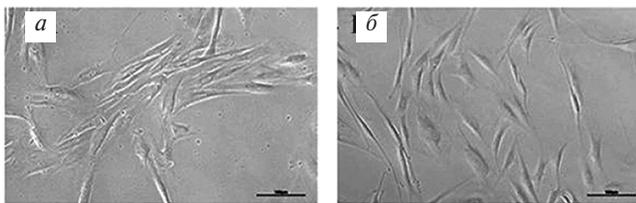


Рис. 1. Микрофотографии дермальных фибробластов человека *in vitro*. (а) Фибробласты линии DF1 (получены от здорового донора) и (б) линии HDDF (получены от донора с болезнью Хантингтона). Фазово-контрастная микроскопия, $\times 10$. Масштаб 100 мкм.

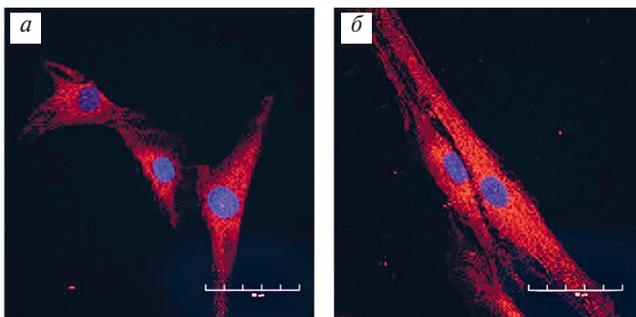


Рис. 2. Визуализация диффузного распределения белка хантингтина в цитоплазме дермальных фибробластов. (а) Клетки линии DF1 (здоровый донор) и (б) клетки линии HDDF (донор с болезнью Хантингтона). Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к хантингтину mEM48 (вторичные антитела конъюгированы с Alexa 555) (красный). Ядра клеток визуализированы красителем DAPI (синий). Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 50 мкм.

во многом обусловлено низкой эффективностью процедуры этого метода и сильной гетерогенностью получаемых нейронов [16]. В предыдущем исследовании нами был оптимизирован протокол прямого репрограммирования, который позволил увеличить как выживаемость индуцированных нейронов стриатума (до 80%), так и гомогенность полученной популяции клеток [17].

В настоящем исследовании, методом прямого репрограммирования, нами получены нейроны стриатума из линии дермальных фибробластов HDDF от пациента с БХ и контрольных клеток линии DF1 от здорового донора [18]. На рис. 1 представлен общий вид культуры дермальных фибробластов *in vitro* от пациента с БХ и от донора без нейропатологии. Показано, что хантингтин распределен диффузно в цитоплазме обеих популяций фибробластов без видимых агрегатов (рис. 2). Однако существенное отличие наблюдается в нейронах стриатума, полученных из этих фибробластов. На рис. 3 показано, что в нейронах, полученных из фибробластов линии DF1, хантингтин по-прежнему распределен диффузно по цитоплазме и видимых агрегатов не образует. Вместе с тем, в нейронах, полученных из фибробластов линии HDDF, были визуализированы агрегаты хантингтина в some нейронах и в некоторых отростках этих клеток.

Таким образом нами было подтверждено, что в нейронах, полученных из фибробластов пациентов с БХ наблюдаются агрегаты мутантного белка, что является основным гистопатологическим признаком данной нейропатологии. Полученная клеточная модель отражает основные патологические изменения, происходящие в клетках при развитии БХ и имеет потенциал для применения в качестве платформы для оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов.

Существующие подходы персонализированной медицины предполагают подбор фармацевтической терапии, эффективной для конкретного пациента. Несмотря на то, что эффективные препараты для лечения или предотвращения БХ пока не разработаны, можно предположить, что их эффективность будет зависеть от знания генотипа и возраста пациента, а также стадии развития заболевания. Учитывая аутосомно-доминантный тип наследования БХ, можно предположить, что знание особенностей течения болезни у представителей старшего поколения семей, будет способствовать разработке методов лечения носителей БХ младших поколений, принимая во внимание их возрастные особенности. В данном случае использование технологии прямого репрограммирования становится необходимым инструментом для подбора терапии, наиболее безопасной и эффективной для конкретных пациентов.

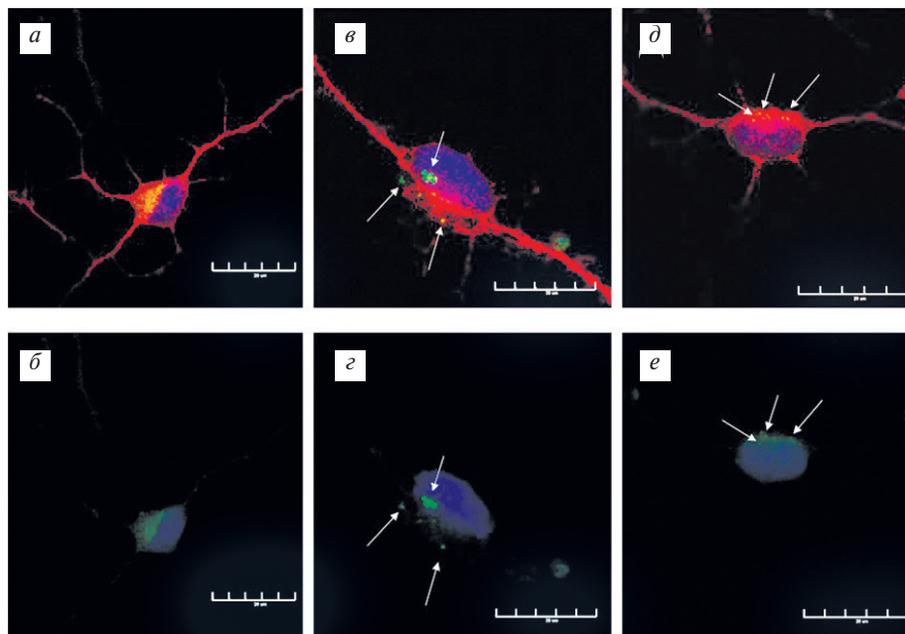


Рис. 3. Визуализация белка хантингтина (зеленый) в нейронах стриатума, полученных методом прямого репрограммирования из дермальных фибробластов: (а и б) клеток линии DF1 (здоровый донор) и (в, з, д, е) из клеток линии HDDF (донор с болезнью Хантингтона). Показан результат иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к нейрональному маркеру MAP2 (вторичные антитела конъюгированы с Alexa 555) и антителами к хантингтину mEM48 (вторичные антитела Alexa 488). Ко-локализация этих двух белков проявляется в желтом окрашивании. Ядра клеток визуализированы красителем DAPI (синий). Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 30 мкм. В нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов здорового донора, хантингтин в цитоплазме распределен диффузно (а и б), в то время как в нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов пациента с болезнью Хантингтона, наблюдаются агрегаты этого белка (показаны стрелками) (в, з, д и е).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение дермальных фибробластов

Фибробласты от пациента с подтвержденным диагнозом БХ выделяли из биоптата кожи, согласно протоколу описанному ранее [18]. Пациент – женщина 36 лет с подтвержденным диагнозом БХ. В результате генетического исследования в гене белка хантингтина обнаружено 47 повторов кодона CAG. Перед забором ткани, который был осуществлен в условиях медицинского учреждения, проводили медицинский осмотр донора и получали его информированное добровольное согласие на забор ткани и использование клеток, полученных из нее, в научных исследованиях. Для работы с клетками было получено одобрение этической комиссии ИНЦ РАН (Протокол № 12/23 от 08.08.2023).

Клетки из фрагмента биоптата кожи выделяли механическим способом и культивировали в среде, содержащей 90% DMEM/F12 (Биолот, Россия) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25%) – Версена (0,2%) по достижению ими 90% конфлюэнтности. Кратность

рассева составляла 1:3–1:5. Клетки активно пролиферировали, их жизнеспособность после криоконсервации составляла 80%. В качестве контроля использовали дермальные фибробласты линии DF1, полученные от здорового донора – женщины 37 лет (клетки были получены из ЦКП Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН).

Прямое репрограммирование дермальных фибробластов в нейроны стриатума

Для процедуры репрограммирования использовали лентивирусные векторы, кодирующие микро РНК miR-9/9* и miR-124 (инициируют ремоделирование хроматина), транскрипционные факторы MYT1L и DLX2 (направляют дифференцировку в ГАМКэргические нейроны) и STIP2 (направляет дифференцировку в нейроны стриатума). Экспрессия микроРНК контролировалась доксициклин-индуцибельным промотором. После селекции антибиотиком постмитотические клетки пересаживали на стекла, покрытые матригелем. Кондиционную среду для фибробластов на следующий день заменяли на среду для репрограм-

мирования, содержащую Neurobasal-As добавлением 2% B-27, 0.125 мМ добавки GlutaMAX (все Gibco, США), 1 мМ вальпроевой кислоты 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 мкМ дибутилц АМФ (SigmaAldrich, США), 20 нг/мл нейротрофического фактора мозга, 20 нг/мл нейротрофина 3 типа (PepcoTech, Великобритания) и 20 нг/мл нейротрофического фактора глиального клеточного происхождения. Клетки культивировали в течение 40 дней с момента инфицирования лентивирусами. Визуализацию хантингина проводили при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания клеток антителами mEM48 (Merck Millipore).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-1063 (результаты на рис. 1 и 2) и грантом РНФ № 22-75-00106 (результаты на рис. 3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group // *Cell*. 1993. V. 72. P. 971–983.
2. DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P., Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // *Science*. 1997. V. 277. P. 1990–1993.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
4. Consortium H. D. i. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. P. 264–278.
5. Nekrasov E. D., Vigont V. A., Klyushnikov S. A., Lebedeva O. S., Vassina E. M., Bogomazova A. N., Chestkov I. V., Semashko T. A., Kiseleva E., Suldina L. A., Bobrovsky P. A., Zimina O. A., Ryzantseva M. A., Skopin A. Y., Illarioshkin S. N., Kaznacheyeva E. V., Lagarkova M. A., Kiselev S. L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // *Mol Neurodegener*. 2016. V. 11. P. 27.
6. Vigont V., Nekrasov E., Shalygin A., Gusev K., Klushnikov S., Illarioshkin S., Lagarkova M., Kiselev S. L., Kaznacheyeva E. Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting // *Front Pharmacol*. 2018. V. 9. P. 696.
7. Tang Y., Liu M. L., Zang T., Zhang C. L. Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons // *Front Mol Neurosci*. 2017. V. 10, 359.
8. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol*. 2013. V. 14. P. R115.
9. Le Cann K., Foerster A., Rosseler C., Erickson A., Hautvast P., Giesselmann S., Pensold, D., Kurth I., Rothermel M., Mattis V. B., Zimmer-Bensch G., von Horsten S., Denecke B., Clarner T., Meents J., Lampert A. The difficulty to model Huntington's disease in vitro using striatal medium spiny neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells // *Sci Rep*. 2021. V. 11. P. 6934.
10. Machiela E., Jeloka R., Caron N. S., Mehta S., Schmidt M. E., Baddeley H. J. E., Tom C. M., Polturi N., Xie Y., Mattis V. B., Hayden M. R., Southwell A. L. The Interaction of Aging and Cellular Stress Contributes to Pathogenesis in Mouse and Human Huntington Disease Neurons // *Front Aging Neurosci*. 2020. V. 12. P. 524369.
11. Victor M. B., Richner M., Olsen H. E., Lee S. W., Monteyts A. M., Ma C., Huh C. J., Zhang B., Davidson B. L., Yang X. W., Yoo A. S. Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes // *Nature neuroscience*. 2018. V. 21. P. 341–352.
12. Mertens J., Paquola A. C. M., Ku M., Hatch E., Bohnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J. R., Goncalves J. T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J., Hetzer M. W., Gage F. H. Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects // *Cell Stem Cell*. 2015. V. 17. P. 705–718.
13. Liu Y., Xue Y., Ridley S., Zhang D., Rezvani K., Fu X. D., Wang H. Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e109621.
14. Monk R., Lee K., Jones K. S., Connor B. Directly reprogrammed Huntington's disease neural precursor cells generate striatal neurons exhibiting aggregates and impaired neuronal maturation // *Stem Cells*. 2021. V. 39. P. 1410–1422.
15. Oh Y. M., Lee S. W., Kim W. K., Chen S., Church V. A., Cates K., Li T., Zhang B., Dolle R. E., Dahiya S., Pak S. C., Silverman G. A., Perlmutter D. H., Yoo A. S. Age-related Huntington's disease progression modeled in directly reprogrammed patient-derived striatal neurons highlights impaired autophagy // *Nat Neurosci*. 2022. V. 25. P. 1420–1433.
16. Samoilova E. M., Kalsin V. A., Kushnir N. M., Chistyakov D. A., Troitskiy A. V., Baklaushev V. P. Adult Neural Stem Cells: Basic Research and Production Strategies for Neurorestorative Therapy // *Stem Cells Int*. 2018. V. 2018. P. 4835491.
17. Kraskovskaya N., Bolshakova A., Khotin M., Bezprozvanny I., Mikhailova N. Protocol Optimization for Direct Reprogramming of Primary Human Fibroblast into Induced Striatal Neurons // *Int J Mol Sci*. 2023. V. 24.

18. Krylova T.A., M.A.S., Zenin V.V., Koltsova A.M., Kropacheva I.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G. G. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age // Tsitologia. 2016. V. 58. P. 850–864.

DIRECT REPROGRAMMING OF SOMATIC SKIN CELLS FROM A PATIENT WITH HUNTINGTON'S DISEASE INTO STRIATAL NEURONS TO CREATE MODELS OF PATHOLOGY

N. A. Kraskovskaya[#], M. G. Khotin,

Corresponding Member of the RAS A. N. Tomilin, N. A. Mikhailova

Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

[#]*E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com*

A new *in vitro* model of Huntington's disease (HD) has been developed, based on the direct reprogramming of dermal fibroblasts from patients with the disease into striatal neurons. Direct reprogramming makes it possible to obtain neurons, preserving the epigenetic information inherent in the cells of a specific donor, and, consequently, the age-associated phenotype of the disease. The new model resembles the main histopathological feature of Huntington's disease – the accumulation of aggregates of the mutant huntingtin protein in striatal neurons obtained from the patient's fibroblasts. Conducting experiments on induced neurons from patients in culture, obtained using direct reprogramming, allows us to individually assess the degree of progression of neuropathology and implement a personalized approach in choosing a treatment strategy and selecting drugs for therapy. The *in vitro* model of Huntington's disease can be used for preclinical drug studies, for the treatment of neurodegenerative diseases and for assessing their effectiveness on neurons of specific patients.

Ключевые слова: direct reprogramming, Huntington's disease, neurons, striatum, fibroblasts, huntingtin protein aggregates