

Современные возможности исследования клеточных и молекулярных механизмов болезни Паркинсона

В.В. Симонова

ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Москва)

Болезнь Паркинсона (БП) является классическим нейродегенеративным заболеванием, которое по своему молекулярному патогенезу принято относить к группе конформационных болезней мозга [1]. Известно, что эта патология сопровождается нарушением полимеризации и фолдинга (процесса спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру) белка α -синуклеина – основного компонента телец Леви. Между собственно гибелью нигральных дофаминергических нейронов и сроками манифестации БП проходит определенный период времени. Благодаря пластичности мозга клиническая картина становится явной только после гибели 50% клеток черной субстанции и снижения уровня дофамина в полосатом теле на 80–85%.

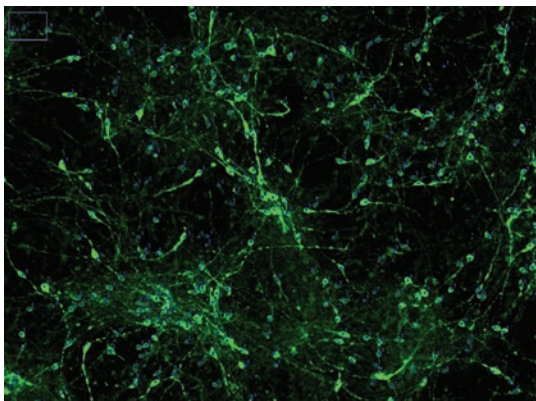
В основном БП носит спорадический характер. В то же время около 10% случаев заболевания определяются мутациями двух десятков “больших” генов паркинсонизма [2–5]. Из них от 4 до 16% выявляемых мутаций отвечают за формы БП с началом до 40–45 лет: подавляющее большинство таких ранних случаев связаны с изменениями в генах *PARK2* (MIM602544), *PINK1* (MIM608309) и *DJ-1* (MIM602533) [4]. Для наследственно-семейных форм БП характерны аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный типы передачи болезни. По аутосомно-доминантному типу наследуются формы, обусловленные мутациями генов *PARK8/LRRK2* (обогащенная лейциновыми повторами киназа), *PARK1/SNCA* (α -синуклеин), *PARK5/UCHL1*, *PARK11/GIGYF2*, *PARK13/Omi/Htra2*. Аутосомно-рецессивные варианты первичного пар-

кинсонизма связаны с генами *PARK2*/паркин, *PARK6/PINK1*, *PARK7/DJ-1*, *PARK9/ATP13A2* и др. Для указанных локусов характерны не только точковые мутации, но и изменения “дозы” – делеции, дупликации, трипликации и т.д.; описаны также более крупные хромосомные перестройки, ассоциированные с риском развития БП [6, 7].

Моделирование БП с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Учитывая вышеизложенную гетерогенную основу БП и отсутствие радикальных способов лечения, необходимым является создание адекватных моделей для изучения молекулярных и клеточных механизмов заболевания, в том числе моделей *in vitro*. Долгое время такие исследования были невозможны из-за трудности доступности биоматериала. В настоящее время данный барьер преодолен благодаря технологии **клеточного репрограммирования**, при этом универсальным и доступным материалом для ученых стали фибробласты. Клетки, полученные от пациентов в виде биоптата кожи, культивируются в CO_2 -инкубаторе при 37°C. Дальнейшая работа с этим материалом включает превращение фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые, подобно эмбриональным стволовым клеткам, обладают практически неограниченным пролиферативным потенциалом. Далее осуществляется направленная дифференцировка ИПСК до стадии нейронов. Соматические клетки паци-





Дофаминергические нейроны в культуре нейрональных клеток, полученных из ИПСК пациента с БП (синий цвет – окраска на тирозингидроксилазу).

ентов с различными формами БП могут быть репрограммированы в ИПСК с помощью лентивирусных векторов и вектора на основе РНК-содержащего вируса Сендай – эти рекомбинантные конструкции помогают ввести в клетку особые пептидные факторы репрограммирования (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc и др.). Таким путем в нашей лаборатории совместно с Институтом молекулярной генетики РАН (Москва) были получены ИПСК с мутациями генов *LRRK2*, *PARK2*, *GBA*, а также линии ИПСК от пациентов со спорадической формой БП. Проведенные эксперименты позволили создать уникальную “персонализированную” клеточную платформу для изучения патогенеза конкретных форм БП [8]. Получение таким путем клеточных культур, обогащенных дофаминергическими нейронами, подтверждается экспрессией маркера этих нейронов – фермента тирозингидроксилазы и транспортера дофамина (рисунок).

Ключевой мишенью патологического процесса при БП являются митохондрии. Так, киназа *LRRK2* (продукт одного из наиболее часто мутирующих при БП генов) представляет собой мультидоменный фермент, около 10% которого ассоциированы с внешней мембраной митохондрий. Мутации часто расположены в доменах, отвечающих за киназ-

ную (фосфорилирующую) и ГТФазную (гидролизующую) активность *LRRK2* [9]. В норме киназный домен *LRRK2* фосфорилирует цитоплазматический белок Dgr1, активируя данный протеин. Последний, взаимодействуя с сайтами узнавания на внешней мембране митохондрии, способствует фрагментации органеллы и высвобождению при этом активных форм кислорода и факторов апоптоза [10, 11]. Фрагментирование поврежденной митохондрии предотвращает ее слияние с нормально функционирующей органеллой. Исследователи обнаружили в нейронах, несущих мутацию G2019S гена *LRRK2*, наличие малых по размеру митохондрий, число которых превышает таковое в норме, что указывает на повышенную фрагментацию митохондрий [12]. Результатом повреждения митохондрий становится активация балка *PINK1*, что ведет к фосфорилированию белка паркина (продукта гена *PARK2*) и влияет на процессы аутофагии в нейронах. Мутации как в гене *PINK1*, так и в гене *PARK2* ассоциированы с БП [13, 14]. Исследователи получили ИПСК от больных с мутацией в гене *PINK1* и после дифференцировки их в дофаминергические нейроны выявили нарушение рекрутирования белка к митохондриальной мембране; введение в эти клетки ретровируса с нормальным геном *PINK1* восстановило взаимодействие паркина с митохондриями [15].

На другой клеточной модели БП были получены дофаминергические нейроны, дифференцированные из ИПСК от пациентов с *LRRK2*-ассоциированной формой БП, при этом были обнаружены увеличение сродства α -синуклеина с лизосомальной мембраной и склонность к избыточному формированию телец Леви [16].

В последнее время активно изучается связь мутаций гена β -глюкоцереброзидазы (*GBA*) с БП [17]. Повреждения данного гена в гомозиготном состоянии приводят к лизосомной болезни накопления – болезни Гоше (при которой риск развития паркинсонизма повышен в 20 раз), тогда как при носительстве гетерозиготных мутаций *GBA* риск заболеть

БП увеличен в 5 раз. Глюкоцереброзиды – вещества липидной природы, встроенные в клеточную мембрану, с которой тесно ассоциирован α -синуклеин, поэтому предполагается, что изменение состава мембраны при мутациях *GBA* может непосредственно влиять на метаболизм α -синуклеина [18]. С помощью технологии ИПСК были получены *GBA*-мутантные клеточные линии от больных БП и от пациентов с болезнью Гоше, а также клетки с генетически скорректированной мутацией. В мутантных нейронах от больных БП и болезнью Гоше наблюдали накопление глюкоцереброзидов и α -синуклеина, а также повышенный уровень одного из маркеров аутофагии – LC3-II [18]. Эти и другие исследования ярко демонстрируют возможности клеточной технологии репрограммирования в установлении ключевых звеньев и триггеров патогенетического каскада при различных генетических формах БП [19].

Болезнь Паркинсона и методы редактирования генома

Методы редактирования генома, стремительно ворвавшиеся в фундаментальную биологию и медицину в начале 2010-х годов, стали важным исследовательским инструментом и одновременно новым потенциальным терапевтическим подходом при моногенных заболеваниях нервной системы, в том числе при генетических формах БП. Редактирование генома дает возможность внести целенаправленные изменения в таргетные участки генов интереса, корректируя мутантные нуклеотидные последовательности или, напротив, создавая нужные мутации на модельных объектах. Одним из наиболее привлекательных объектов для геномного редактирования являются ИПСК в силу возможности моделирования “пациентспецифичной” патологии и изучения функций конкретных генов [20].

Редактирование генома является одним из видов геномной инженерии с использованием специфически спроектированных эндонуклеаз (“молекулярных ножниц”). Эти нуклеазы

создают сайтспецифичные двухцепочечные разрывы ДНК в строго определенном участке генома. Иногда ученые используют особые варианты эндонуклеаз – никазы, “режущие” лишь одну цепь двухцепочечной ДНК в сайтах рестрикции. Индуцированные разрывы ДНК затем восстанавливаются при рекомбинации, а сам процесс репарации ДНК при этом сопровождается встраиванием нужных нуклеотидов (что и составляет сущность “редактирования” генома). Общая стратегия геномной инженерии с помощью сайтспецифических нуклеаз включает четыре основных этапа: выбор целевой нуклеотидной последовательности в геноме; создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень; доставку этой конструкции в клеточное ядро; анализ полученных мутаций.

Известны три методики редактирования генома, различающиеся типом используемых нуклеаз: 1) нуклеазы с ДНК-связывающими мотивами типа “цинковых пальцев” (zinc fingers, ZFN); 2) нуклеазы TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease); 3) система CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 protein). Использование системы CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ перед методами, основанными на ZFN и TALEN. Эту модель значительно проще создать, она имеет более высокую эффективность, подходит для высокопроизводительного редактирования генома в самых разных клеточных линиях. Она основана на использовании естественных бактериальных комплексов, состоящих из белков и РНК. Эти комплексы защищают бактериальные клетки от вторжения вирусов путем распознавания и разрезания вирусной РНК. Взяв за основу эти структуры, ученые создали ДНК-комплексы, представляющие собой нуклеазу Cas9, связанную с короткими цепочками РНК. Эти последовательности по принципу комплементарности взаимодействуют с последовательностями ДНК, а Cas9 разрезает их в указанном месте. Для переориентации на новую мишень нужно только поменять 20-нуклеотидную направляющую последова-

тельность РНК. Высокая эффективность, простота сборки отдельных компонентов в условиях современной лаборатории, устойчивость к эпигенетическим модификациям — все эти свойства системы CRISPR/Cas9 привели к тому, что в данный момент она является самой используемой разновидностью технологии геномного редактирования для создания моделей заболеваний человека *in vitro* и *in vivo* [21].

Геномное редактирование с использованием нуклеазной системы CRISPR/Cas9 активно применяется для моделирования патологии ИПСК. В многочисленных экспериментах, в том числе проведенных в нашей лаборатории, было показано, что коррекция мутаций в генах паркинсонизма с использованием CRISPR/Cas9 не только позволяет уточнить вклад генов интереса в тот или иной патогенетический путь, но и существенно улучшает результаты экспериментальной терапии БП, например нейротрансплантации у крыс с токсической моделью паркинсонизма [22].

Следует помнить, что редактирование генома ИПСК может быть сопряжено с появлением мутаций в результате нецелевой активности нуклеаз или других причин, что пока затрудняет применение таких культур в клинике. Проведенные молекулярные и цитогенетические анализы кариотипов выявили вновь возникшие незапланированные точечные мутации, хромосомные aberrации, анеуплоидии или полиплоидии, которые, однако, в большинстве случаев не являются значимыми [23, 24]. Предполагается, что геномные aberrации возникают независимо от того, применялись ли интеграционные или неинтеграционные методы доставки транскрипционных факторов репрограммирования [25]. Продукты мутантных генов сами по себе могут оказывать влияние на стабильность ядерного или митохондриального генома, что необходимо учитывать при геномном редактировании [26].

Таким образом, вышеописанные новые технологии позволяют эффективно работать с клеточными моделями БП, что повышает

информативность и общий уровень проводимых фундаментальных исследований. Данные, представленные в этом обзоре, показывают, что в настоящее время экспериментальное изучение двигательных расстройств является одной из горячих точек неврологии и нейробиологии.

Список литературы

1. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К; 2002.
2. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. Hum. Mol. Genet. 2009;18(R1):R48-59.
3. Bekris L.M., Mata I.F., Zabetian C.P. The genetics of Parkinson disease. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2010;23:228-42.
4. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease — state of the art, 2013. Parkinsonism Relat. Disord. 2014;20:S23-8.
5. Deng H.-X., Shi Y., Ahmeti K.B. et al. Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. Nat. Genet. 2016;48:733-9.
6. Ambroziak W., Kozirowski D., Duszyc K. et al. Genomic instability in the PARK locus is associated with Parkinson's. J. Appl. Genet. 2015;56:451-61.
7. Mok K.Y., Sheerin U., Simón-Sánchez J. et al. Deletions at 22q11.2 in idiopathic Parkinson's disease: a combined analysis of genome-wide association data. Lancet. Neurol. 2016;15:585-96.
8. Novosadova E., Nekrasov E.D., Chestkov I.V. et al. A platform for studying molecular and cellular mechanisms of Parkinson's disease based on human induced pluripotent stem cells. Neurosci. Res. 2016;8:157-65.
9. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy. J. Mol. Med. 2017;95:705-18.
10. Zhang Z., Liu L., Wu S., Xing D. Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis. FASEB J. 2016;30:466-76.
11. Hagberg H., Mallard C., Rousset C.I., Thornton C. Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain. Lancet. Neurol. 2014;13:217-32.
12. Su Y.-C., Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. Hum. Mol. Genet. 2013;22:4545-61.

13. Nguyen T.N., Padman B.S., Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy. *Trends Cell Biol.* 2016;26:733-44.
14. Popovic D., Vucic D., Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat. Med.* 2014;20:1242-53.
15. Seibler P., Graziotto J., Jeong H. et al. Mitochondrial parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 2011;31:5970-6.
16. Orenstein S.J., Kuo S.-H., Tasset I. et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* 2013;16:394-406.
17. Dvir H., Harel M., McCarthy A.A. et al. X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 2003;4:704-9.
18. Schöndorf D.C., Aureli M., McAllister F.E. et al. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat. Commun.* 2014;5:4028.
19. Sánchez-Danés A., Richaud-Patin Y., Carballo-Carbajal I. et al. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* 2012;4:380-95.
20. Закиян С.М., Медведев С.П., Дементьева Е.В., Власов В.В. Редактирование генов и геномов. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2016.
21. Choi P.S., Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Nat. Commun.* 2014;5:3728.
22. Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривеников И.А. Моделирование болезни Паркинсона с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. М.: Соверо Пресс; 2016.
23. Ветчинова А.С., Симонова В.В., Новосадова Е.В. и др. Цитогенетический анализ результатов геномного редактирования на клеточной модели болезни Паркинсона. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018;3:355-9.
24. Dekel-Naftali M., Aviram-Goldring A., Litmanovich T. et al. Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012;20:1248-55.
25. Gore A., Li Z., Fung H.-L. et al. Somatic coding mutation in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;471(7336):63-7.
26. Lee S.Y., Chung S.-K. Integrating gene correction in the reprogramming and transdifferentiation processes: a one-step strategy to overcome stem cell-based gene therapy limitations. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2416192.