

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и болезнь Паркинсона: проблема геномной нестабильности

В.В. Симонова

ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Москва)

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), получаемые путем генетического репрограммирования из соматических клеток (чаще всего фибробластов), являются весьма перспективным объектом в изучении фундаментальных основ болезни Паркинсона (БП), особенно ее генетических форм. Появившаяся возможность генерации из ИПСК дофаминергических нейронов дала старт развитию нового подхода к нейротрансплантации при БП [1]. Однако изучение генома ИПСК обнаруживает в клетках присутствие повышенного уровня геномной нестабильности, что является серьезной проблемой для дальнейшего клинического продвижения данной технологии.

Геномные перестройки ИПСК и их возможные причины

Примерно 10% клеточных линий ИПСК человека содержат по крайней мере одну хромосомную перестройку. Наиболее часто встречаются цитогенетические нарушения в виде аномального изменения числа хромосом — анеуплоидий. Такие перестройки преимущественно затрагивают хромосомы 8, 12, 17, 20 и X [2, 3]. В ДНК плюрипотентных стволовых клеток также обнаружены изменения числа копий хромосомных сегментов (copy number variation — CNV) как результат несбалансированных хромосомных перестроек. Наконец, в геноме ИПСК регистрируются и типичные однонуклеотидные замены, или точечные мутации (single nucleotide polymorphism — SNP) [4]. Однако наиболее опасной формой повреждения ДНК являются двуцепочечные

разрывы молекулы, которые инициируют хромосомные перестройки и ведут к несбалансированному набору генов в ядре клеток.

В процессе генерации ИПСК клетки проходят ряд перестроек. Сам метод репрограммирования соматической клетки в ИПСК, который осуществляется путем введения в клетку генов плюрипотентности или их продуктов (РНК, белковые факторы), предполагает прямое или косвенное воздействие на молекулу ДНК. Превращение соматических клеток в ИПСК невозможно без прохождения клеткой этапа стирания/восстановления “эпигенетических меток” (так называемый “сброс эпигенома”). Сущность этого процесса состоит в удалении совокупности метильных групп (CH_3), контролирующих активность генов [5]. При этом процесс деметилирования ДНК ведет к активной транскрипции генов плюрипотентности [6]. Перестройка генома клетки при генерации ИПСК связана с реактивацией X-хромосомы и потерей импринтинга для некоторых генов [7]. В последнее время высказывается предположение, что приобретение геномом нестабильности при клеточном репрограммировании обусловлено именно эпигенетической памятью, которая в областях с низким метилированием сохраняется в течение многих пассажей [7, 8]. Метилирование ДНК имеет решающее значение в судьбе клеток, так как принимает непосредственное участие в экспрессии генов плюрипотентности [9].

По сравнению с дифференцированными соматическими клетками ИПСК быстрее пролиферируют, приобретая короткий кле-

точный цикл, подобный циклу эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) [10]. Такая модификация связана с изменением длительности фазы G1, ответственной за рост клетки, процессы синтеза в ней белков и мРНК. Плюрипотентные клетки тратят приблизительно 65% времени на S-фазу и только около 15% на фазу G1, в то время как дифференцированные клетки расходуют около 40% времени на фазу G1 [10]. Быстрая репликация клеток коррелирует с появлением в них дополнительного числа centrosом, и в этом ИПСК сходны с другими типами быстроделющихся клеток [11]. Являясь основным центром организации микротрубочек, centrosомы опосредованно влияют на сегрегацию хромосом в митозе [12]. Однако приобретение дополнительного числа подобных органоидов не является преимуществом для клеток, поскольку есть основания полагать, что хромосомная нестабильность в ИПСК напрямую связана с присутствием дополнительных centrosом [13]. Экспрессия репрограммирующих факторов вызывает в генерируемых клетках репликационный стресс, распознаваемый в S-фазе серин-треониновой протеинкиназой (ATR-киназой), отслеживающей повреждения ДНК. В норме эта киназа верифицирует одноцепочечную ДНК в стрессовой репликационной вилке и инициирует ряд реакций, останавливающих клеточный цикл [14], однако в ИПСК (как и в ЭСК) эти контрольные реакции дефектны [15]. Таким образом, быстрая пролиферация ИПСК повышает риск возникновения геномных aberrаций, в то время как слабость “контрольных точек” позволяет этим aberrациям проходить через клеточный цикл.

Хромосомную нестабильность могут провоцировать условия культивирования. Так, один из механизмов анеуплоидии заключается в “эффекте стороннего наблюдателя”: после возникновения одного события анеуплоидии в культуре ИПСК соседние с мутантной клетки могут также приобретать анеуплоидии путем передачи соответствующих биологически активных веществ через питательную среду или посредством доставки в экзосомах

[16]. Помимо этого высокий уровень анеуплоидий, наблюдаемых в ИПСК, обусловлен нарушением механизмов, влияющих на митотическую сегрегацию хромосом, сборку веретена деления, истощение компонента ядерной мембраны ламина В [16]. Необходимо упомянуть также белок сурвивин – ингибитор апоптоза, защищающий клетку от полиплоидии благодаря своей функции досмотра “контрольной точки” сборки веретена и цитокинеза. Этот белок имеет прямое отношение к молекулярным процессам, связанным с ИПСК, поскольку он играет роль в поддержании плюрипотентного состояния, участвуя в активации одного из канонических пептидных репрограммирующих факторов плюрипотентности – *Oct4* [17, 18]. Было показано, что нарушение экспрессии сурвивина ведет к разрыву полиплоидии в клетках человека [19].

Механизмы геномного надзора и ранимость ИПСК

На сегодняшний день механизмы, которые поддерживают геномную целостность в ИПСК, в значительной степени остаются малопонятными. Каждая клетка сталкивается ежедневно примерно с 10^4 – 10^5 повреждений [20]. Поэтому в клетках отработан сложный, но эффективный механизм репараций ДНК. Однако в ИПСК, как предполагается, геномная нестабильность имеет место на фоне низкой точности восстановления повреждений ДНК [21]. Возможно, на процесс оказывает влияние изменение путей репарации ДНК. Так, например, при лентивирусной трансфекции соматических клеток в процессе образования ИПСК показано увеличение активности NHEJ-зависимого пути репарации (негомологичное соединение концов разрыва ДНК с низкой точностью) и, напротив, снижение HR-зависимых путей репарации ДНК (гомологичная рекомбинация с высокой точностью восстановления) [22, 23].

Надзор за геномом в ИПСК предположительно достигается с помощью такого механизма, как гиперчувствительность к действию апоптотических агентов, что позволяет быстро

удалять клетки после повреждения наследственного материала [24, 25]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки легко погибают даже после воздействия на них низких доз генотоксических агентов. В этих клетках по сравнению с фибробластами зафиксировано снижение уровня транскрипции генов семейства ингибиторов апоптоза (*XIAP*, *BIRC2* и особенно *BIRC3*). В ИПСК зафиксированы не только низкий порог апоптоза, но и эффективная антиоксидантная защита. Гиперчувствительность к апоптозу в ИПСК опосредуется повышенной экспрессией проапоптотического белка BCL-2, а повреждение ДНК предотвращается активацией нескольких антиоксидантных ферментов, и именно гиперчувствительность к апоптозу позволяет удалять клетки с поврежденной ДНК [24, 26]. В ИПСК значительно возрастает экспрессия нескольких антиоксидантных ферментов – *GSTA2* (в 80 000 раз выше, чем в первичных фибробластах), глутатиона (в 3–4 раза выше), одновременно наблюдается значительное возрастание экспрессии нескольких пероксиредоксинов, которые поглощают активные формы кислорода и органические гидропероксиды, а также глутатионредуктазы [26]. Соответственно, содержание активных форм кислорода в ИПСК, согласно проведенным исследованиям, примерно 10 раз ниже, чем в фибробластах.

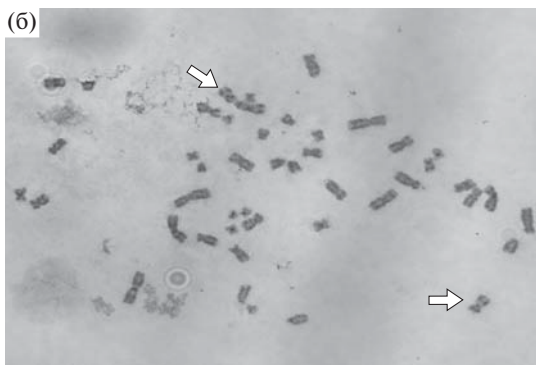
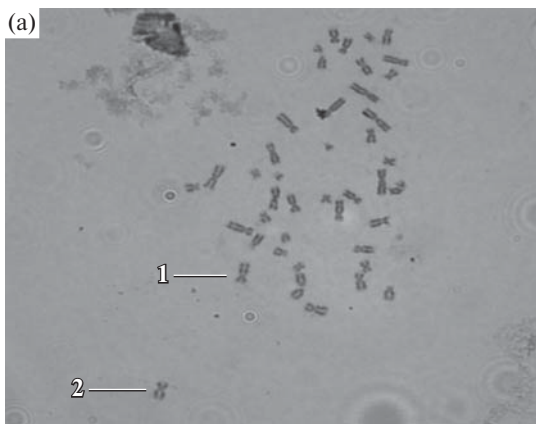
Интересно отметить, что при воздействии различных генотоксических факторов накопление ядерных и митохондриальных повреждений ДНК было значительно ниже в ИПСК, чем в фибробластах. В. Dannemann et al. провели сопоставление ИПСК с большой панелью опухолевых клеточных линий и выявили значимо более редкое повреждение ДНК в ИПСК по сравнению с опухолевыми клетками. Примечательно, что, когда недифференцированные и дифференцированные ИПСК подвергались воздействию генотоксинов, дифференцированные ИПСК явно демонстрировали повышенный уровень повреждения ДНК по сравнению с их недифференцированными аналогами. Как предполагают авторы эксперимента, защита плюри-

потентных стволовых клеток от повреждения ДНК быстро теряется при их дифференцировке [24].

В экспериментах, связанных с изучением БП, проблемы геномной стабильности ИПСК приобретают особенно сложный характер. Во-первых, БП является классическим возрастзависимым заболеванием, частота которого значительно увеличивается у пожилых лиц (до 1–3% в группе старше 70 лет) [1]. Есть основания полагать, что “генетическое поведение” и закономерности функционирования клеточного цикла в фибробластах (либо в репрограммируемых клетках на любых этапах их трансформации и последующей дифференцировки), получаемых в результате биопсии от таких пожилых пациентов, могут существенно отличаться от аналогичных характеристик в “молодых” клетках от доноров в возрасте до 40–50 лет. Во-вторых, некоторые мутации в генах БП могут приводить к специфическим цитогенетическим нарушениям. Это, в частности, касается одного из наиболее значимых “паркинсонических” генов – *LRRK2*: белковый продукт данного гена вовлечен в процесс регуляции F-актина и стабилизацию микротрубочек [27]. Очевидно, что адекватное функционирование микротрубочек веретена деления важно для нормального протекания митоза, поэтому мутации *LRRK2* являются существенным фактором митотической геномной нестабильности.

Пути решения проблемы

В настоящее время активно идет поиск путей, позволяющих минимизировать появление геномной нестабильности ИПСК. Перспективным направлением для получения репрограммированных клеток стало использование неинтегрирующих подходов доставки генов в клетку или применение белков, проницаемых для клеточной мембраны. На смену ранее применявшимся вирусным системам индукции, таким как лентивирусная и ретровирусная, пришли менее “инвазивные” (неинтегрирующие) и более безопасные. Среди них выделяют репрограммирование с



Цитогенетический анализ различных клонов линии ИПСК от пациента с БП. а – клон 1: 1 – нормальная хромосома 11; 2 – перестроенный вариант нормальной хромосомы 11 (der11). б – клон 4: стрелками указаны нормальные хромосомы 11.

участием РНК-вируса Сендай и безвирусные технологии – использование плазмид, белков, микроРНК, синтетических РНК, “малых молекул” и др. M. Hiratsuka et al. разработали искусственную хромосому, содержащую ДНК, в которой закодированы 4 основных репрограммирующих фактора – Klf4, c-Myc, Sox2 и Oct4, а также ген, “выключающий” белок p53 [28]. Альтернативный метод заключается в периодическом введении в культуру соматических клеток синтетической мРНК, кодирующей 5 репрограммирующих факторов (Klf4, c-Myc, Oct4, Sox2 и Lin28) [29]. Весьма перспективны также попытки получить ИПСК путем применения низкомолекулярных соединений [30].

Для обеспечения целостности генома в культуре ИПСК должны строго поддерживаться условия роста, коррелирующие с уровнем активных форм кислорода. Как высокие, так и низкие уровни последних могут нарушать способность клеток к репрограммированию [31]. К тому же повышенные уровни активных форм кислорода также могут ухудшать дифференцировочный потенциал ИПСК [32]. Показана необходимость подбора оптимального уровня активных форм кислорода для нормального роста клеток в культуре и поддержания в них геномной стабильности.

Наметились определенные успехи в преодолении репликативного стресса. Его снижение во время репрограммирования, достигаемое генетическим или химическим путем, обеспечивает снижение нестабильности генома ИПСК. Положительные результаты дает, в частности, исследование киназы 1 контрольной точки клеточного цикла (CHK1) – фермента, играющего ключевую роль в формировании ответа на повреждение ДНК [16]. Увеличение его уровня снижает вызванный репрограммированием стресс репликации и повышает эффективность генерации ИПСК. Аналогичным образом, добавление нуклеозидов во время перепрограммирования снижает груз поврежденной ДНК и количество геномных перестроек ИПСК [33]. Перед использованием ИПСК в клинических исследованиях необходимо контролировать специфические гистоновые метки и статус метилирования ДНК выбранной панели [16].

При репрограммировании клеточную линию целесообразно разделять на клоны. Геномная аномалия может проявиться исключительно в одном клоне, как это произошло в наших исследованиях с линией ИПСК от одного из пациентов с БП [27]: на рисунке видно, что клон 1 несет хромосомную перестройку 46,XY,der11 (а), тогда как клон 4 от того же пациента имеет нормальный кариотип 46,XY (б).

Технологии клеточного репрограммирования сегодня продолжают бурно развиваться и имеют очевидные прикладные перспективы.

Одним из наиболее продвинутых разделов медицины в этом отношении являются нейродегенеративные заболевания, в первую очередь болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона. Очевидно при этом, что трансляция результатов фундаментальных исследований в неврологическую клинику, в том числе применительно к БП, будет невозможна без эффективного решения проблем геномной нестабильности репрограммированных клеток.

Список литературы

1. Симонова В.В. Современные возможности исследования клеточных и молекулярных механизмов болезни Паркинсона. Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. 2018;1:9-13.
2. Taapken S.M., Nisler B.S., Newton M.A. et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2011;29:313-4.
3. Martins-Taylor K., Nisler B.S., Taapken S.M. et al. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2011;29:488-91.
4. Weissbein U., Benvenisty N., Ben-David U. Genome maintenance in pluripotent stem cells. *J. Cell Biol.* 2014;204:153-63.
5. Papp B., Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* 2011;21:486-501.
6. He S., Sun H., Lin L. et al. Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 2017;292:18542-55.
7. Godini R., Lafta H.Y., Fallahi H. Epigenetic modifications in the embryonic and induced pluripotent stem cells. *Gene Expr. Patterns.* 2018;29:1-9.
8. Luu P.L., Gerovska D., Schöler H.R., Araúz-Bravo M.J. Rules governing the mechanism of epigenetic reprogramming memory. *Epigenomics.* 2018;10:149-74.
9. Singer Z.S., Yong J., Tischler J. et al. Dynamic heterogeneity and DNA methylation in embryonic stem cells. *Mol. Cell.* 2014;55:319-31.
10. Ghule P.N., Medina R., Lengner C.J. et al. Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells. *J. Cell. Physiol.* 2011;226:1149-56.
11. Yang A.H., Kaushal D., Rehen S.K. et al. Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 2003;23:10454-62.
12. Schatten H. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem. Cell Biol.* 2008;129:667-86.
13. Ganem N.J., Godinho S.A., Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature.* 2009;460:278-82.
14. Flynn R.L., Zou L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem. Sci.* 2011;36:133-40.
15. Desmarais J.A., Hoffmann M.J., Bingham G. et al. Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells.* 2012;30:1385-93.
16. Henry M.P., Hawkins J.R., Boyle J., Bridger J.M. The genomic health of human pluripotent stem cells: genomic instability and the consequences on nuclear organization. *Front. Genet.* 2018;9:62343.
17. Kapinas K., Kim H., Mandeville M. et al. microRNA-mediated survivin control of pluripotency. *J. Cell. Physiol.* 2015;230:63-70.
18. Mull A.N., Klar A., Navara C.S. Differential localization and high expression of SURVIVIN splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency. *Stem Cell Res.* 2014;12:539-49.
19. Li F., Ackermann E.J., Bennett C.F. et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1999;1:461-6.
20. Giglia-Mari G., Zotter A., Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011;3(1):a000745.
21. Zhang M., Wang L., An K. et al. Lower genomic stability of induced pluripotent stem cells reflects increased non-homologous end joining. *Cancer Commun.* 2018;38:49.
22. Friedberg E.C. A history of the DNA repair and mutagenesis field. The discovery of base excision repair. *DNA Repair.* 2016;37:A35-9.
23. Weeden C.E., Chen Y.S., Ma S.B. et al. Lung basal stem cells rapidly repair DNA damage using the error-prone nonhomologous end-joining pathway. *PLoS Biol.* 2017;15(1):e2000731.



24. Dannenmann B., Lehle S., Hildebrand D.G. et al. High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 2015;4:886-98.
25. Armstrong L., Tilgner K., Saretzki G. et al. Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2010;28:661-73.
26. Dannenmann B., Lehle S., Essmann F., Schulze-Osthoff K. Genome surveillance in pluripotent stem cells: low apoptosis threshold and efficient antioxidant defense. *Mol. Cell Oncol.* 2016;3(2):e1052183.
27. Simonova V.V., Vetchinova A.S., Novosadova E.V. et al. Genome editing and the problem of triploidy in cell modeling of the genetic form of parkinsonism. *Biochemistry (Moscow).* 2018;83(9):1040-5.
28. Hiratsuka M., Uno N., Ueda K. et al. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PLoS One.* 2011;6(10):e25961.
29. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010;7:618-30.
30. Lin T., Wu S. Reprogramming with small molecules instead of exogenous transcription factors. *Stem Cells Int.* 2015;2015:794632.
31. Zhou G., Meng S., Li Y. et al. Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming. *Cell Rep.* 2016;15:919-25.
32. Rönn R.E., Guibentif C., Saxena S., Woods N.B. Reactive oxygen species impair the function of CD90⁺ hematopoietic progenitors generated from human pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2017;35:197-206.
33. Ruiz S., Lopez-Contreras A.J., Gabut M. et al. Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2015;6:8036.