

Применение плюрипотентных и прогениторных стволовых клеток человека для моделирования *invitro* патологических состояний заболеваний сердечно-сосудистой системы и системы крови

Руководитель и ответственный исполнитель исследования:

Директор Института молекулярной биологии и генетики, к.м.н. А.А. Костарева

Перечень научных подразделений, участвовавших в исполнении исследования:

1. НИО молекулярной биологии и генетики.
2. НИЛ молекулярной кардиологии и генетики.

Цель исследования:

Основной целью проекта является моделирование заболеваний, поиск новых терапевтических мишеней и тестирование новых фармакологических препаратов посредством использования прогениторных стволовых клеток человека, полученных из различных источников, а также индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Основной целью данного этапа работ было моделирование в различных клеточных моделях *invitro* патологических процессов, наблюдаемых при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы и системы крови.

Материалы и методы исследования:

Основными клеточными объектами при моделировании являлись мезенхимные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, стромальные стволовые клетки мышечной ткани. Исследование проводилось на когорте пациентов с наследственными генетически-обусловленными заболеваниями сердца.

Методы:

1. Метод секвенирования нового поколения
2. Метод ПЦР, ОТ-ПЦР
3. Метод сайт-специфического мутагенеза на плазмиде
4. Метод ферментативной диссоциации (для выделения культуры мезенхимных клеток сердца из биопсийного материала миокарда)
5. Метод иммуноблоттинга
6. Метод направленного мутагенеза.

Основные результаты:

1. Проведен поиск новых научных данных о факторах, влияющих на функцию и дифференцировочный потенциал стволовых клеток, способах моделирования этих функций с целью повышения их терапевтического и регенераторного потенциала

2. Создается уникальный биобанк мезенхимных стволовых клеток и полученных с их использованием индуцированных плюрипотентных клеток от больных с редкой генетически-обусловленной патологией.

3. Для моделирования выявленных мутаций созданы конструкции на основе вирусного генома для последующей трансдукции стволовых клеток и изучения внутриклеточных механизмов развития заболевания.

Заключение:

В нашем исследовании было показано, что макрофаги продуцируют профибротические медиаторы в присутствии высоких концентраций тромболината, за исключением тканевых ингибиторов металлопротеиназ-1 и -3. Это указывает на то, что макрофаги с онкогенной мутацией Jak2 V617F не продуцируют профибротические медиаторы сами по себе, но имеют большую чувствительность к воздействию тромбоцитарных факторов. Интересно, что увеличение уровня ингибиторов металлопротеиназ в присутствии сыворотки или низких

концентраций тромболизата было показано для макрофагов с оверэкспрессией нормального Jak2, но не для мутантных. Это согласуется с данными, что только 50-60% пациентов с миелофиброзом Jak-позитивны [Cross, 2011]. Эти данные позволяют предположить, что профибротическая активность макрофагов с активацией Jak2, опосредованной не мутацией Jak2 V617F, менее зависима от действия тромбоцитарных факторов, в то время как для макрофагов, экспрессирующих мутацию Jak2 V617F, наличие тромбоцитарных факторов в микроокружении есть необходимое условие.

В соответствии с планом на 2015 год опубликованы статьи: 13

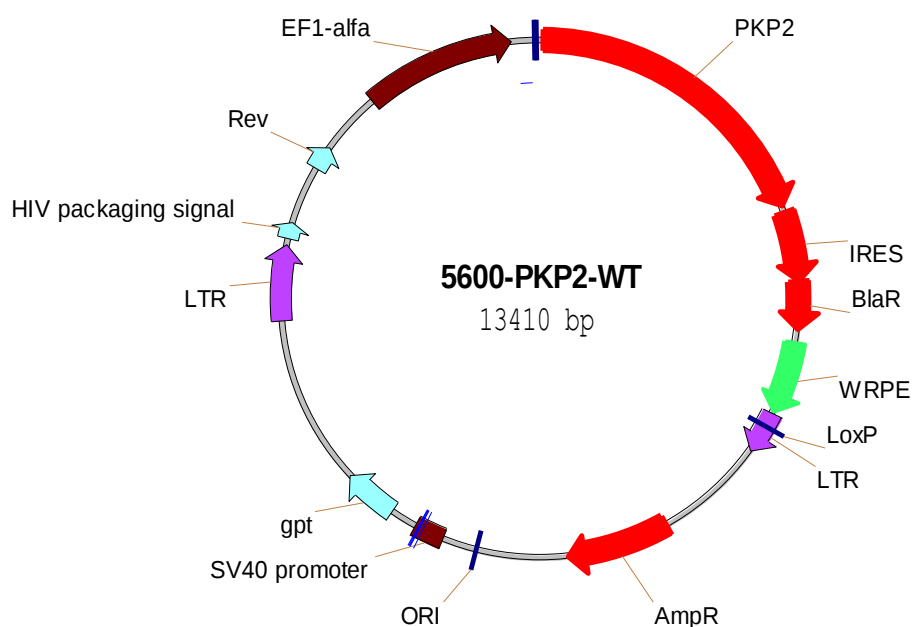


Рис. 1. Карта полученного вектора pLV-T7-PKP2a-Flag, несущего ген PKP2 дикого типа. Обозначения: EF1 α - промотор фактора элонгации 1 α , PKP2 - кодирующая последовательность гена PKP2, IRES - внутренний сайт посадки рибосомы, BlaR - ген устойчивости к бластицидину, LoxP - сайт рекомбинации для Cre-рекомбиназы, LTR - длинный концевой повтор, AmpR - ген устойчивости к ампициллину, ORI - ориджин репликации плазмиды, polyA - поли А участок, PromoterH1 - промотор гистона H1, SV40 promoter - промотор/энхансер вируса SV40, , gpt - полипуриновый участок, HIV packaging signal - сигнал упаковки ВИЧ, Rev - участок связывания белка Rev.

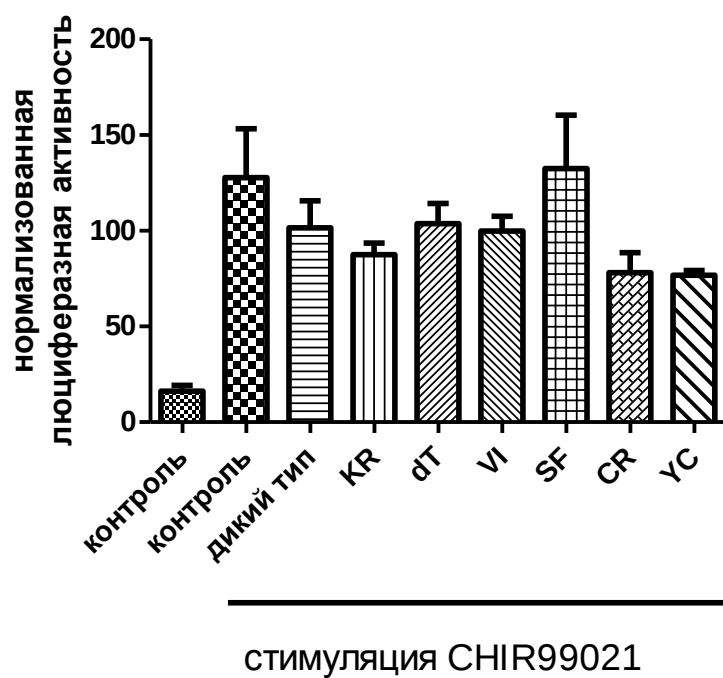


Рис. 2. Результаты Top-Flash анализа влияния мутаций гена PKP2 на активность WNT-сигналлинга. Обозначения: контроль – нетрансдуцированные клетки, дикий тип – клетки, несущие PKP2 дикого типа, KR-YS – клетки, несущие мутантные формы PKP2.

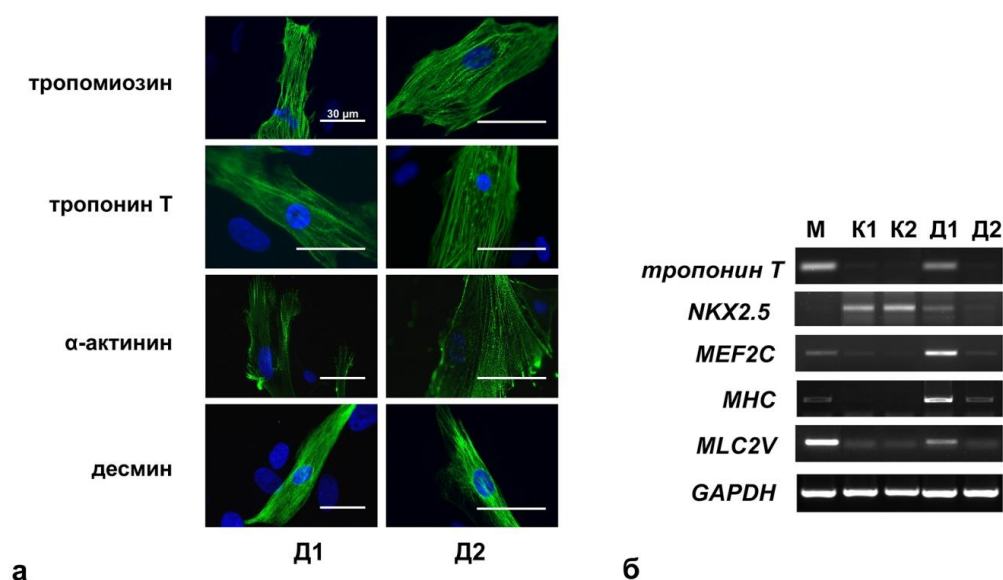


Рис. 3. Характеристика кардиомиоцитов, полученных из иПСК. К1, К2 – недифференцированные контрольные линии иПСК; Д1, Д2 – эти же линии иПСК, дифференцированные в кардиомиоциты; М – миокард человека. Длина масштабной линейки 30 мкм.

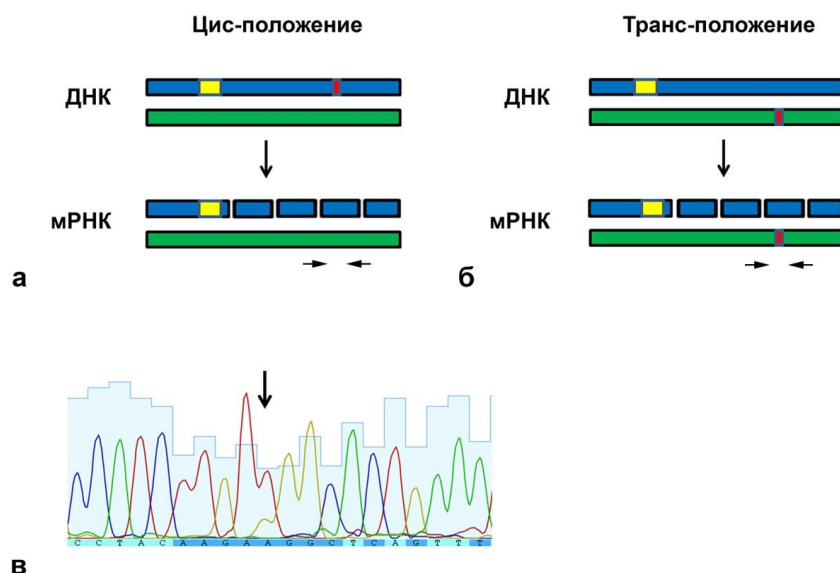


Рис. 4. Определение взаимного расположения двух мутаций в гене *PKP2* пациента АКПЖ1. а– вариант положения двух мутаций на одной аллели (цис-положение); б– вариант положения двух мутаций на разных аллелях (транс-положение); в– Полученная электрофореграмма соответствует цис-положению двух мутаций, вертикальная стрелка указывает на отсутствие мутации. Жёлтым обозначена мутация с.23321delT, красным – мутация K859R. Деградирующая цепочка мРНК показана прерывистой линией. Горизонтальными стрелками схематично показано расположение праймеров для проведения ОТ-ПЦР.

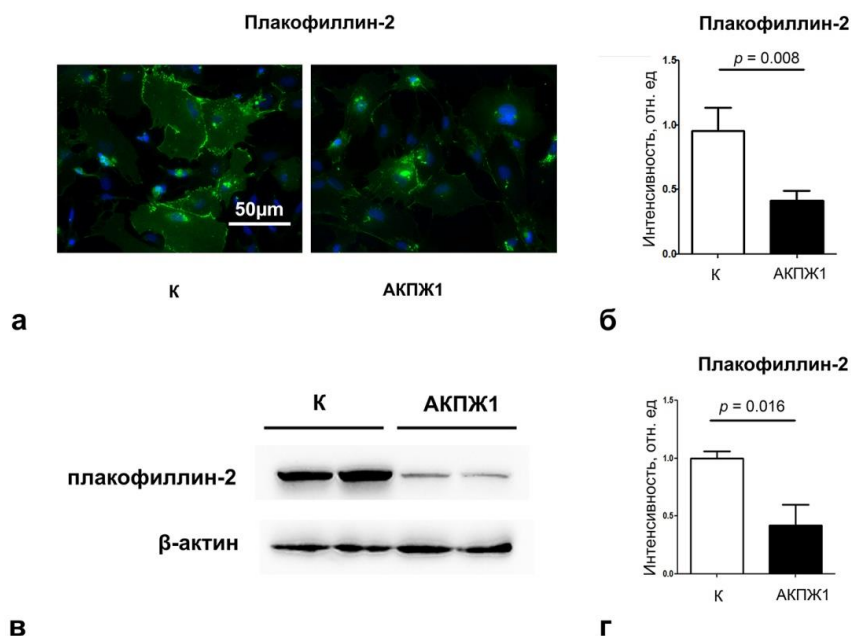


Рис. 5. Уровень плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКПЖ1. а – иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; б – результат измерения интенсивности иммуноцитохимической окраски; в – идентификация плакофиллина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; г – результат измерения интенсивности бандов, соответствующих плакофиллину-2.

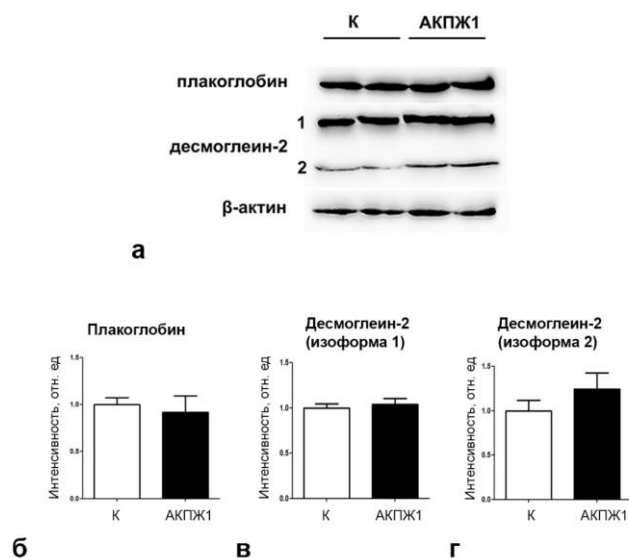


Рис. 6. Уровень плакоглобина и десмоглеина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКПЖ1. *а* – идентификация плакоглобина и десмоглеина-2 в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; *б* – результат измерения интенсивности бандов, соответствующих плакоглобину; *в*, *г* – результат измерения интенсивности бандов, соответствующих изоформам 1 и 2 десмоглеина-2 соответственно.

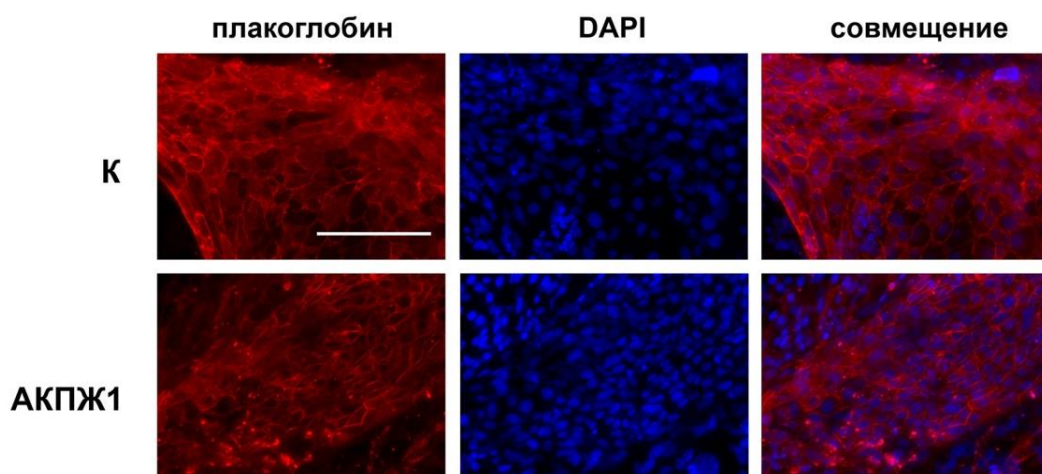


Рис. 7. Локализация плакоглобина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКПЖ1. Длина масштабной линейки 150 мкм.

Перестройка десмосомы может затрагивать β -катенин, ассоциированный с адгезионными контактами, транслокация которого также способна влиять на активность сигнального пути Wnt (Oxford et al., 2014). Нами была выполнена оценка уровня и внутриклеточной локализации β -катенина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКПЖ1 и контрольных линий иПСК. β -катенин был локализован в районе межклеточных контактов и в перинуклеарной части цитоплазмы (рис. 17), различия в его количестве между линиями иПСК не наблюдали.

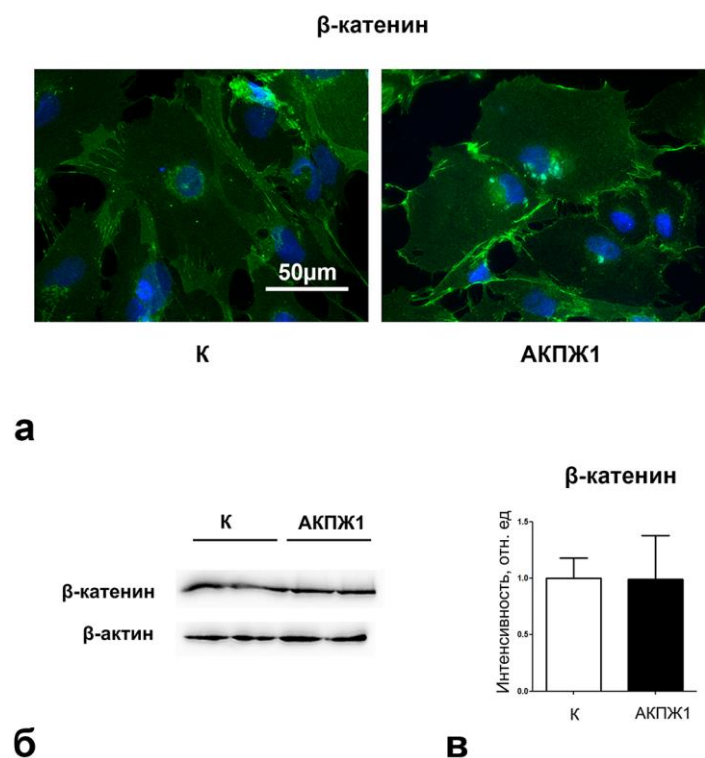


Рис. 8. Локализация и уровень β-катенина в дифференцированных кардиомиоцитах от пациента АКПЖ1. *а* – иммуноцитохимическая окраска дифференцированных кардиомиоцитов; *б* – идентификация β-катенина в дифференцированных кардиомиоцитах методом иммуноблоттинга; *в* – результат измерения интенсивности бандов, соответствующих β-катенину.

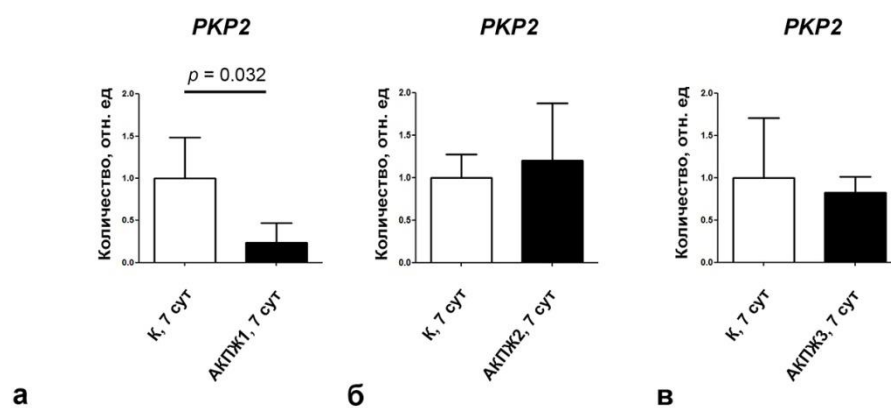


Рис. 9. Экспрессия *PKP2* на 7 сутки кардиодифференцировки и ПСК от пациентов с АКПЖ и контрольных линий и ПСК.

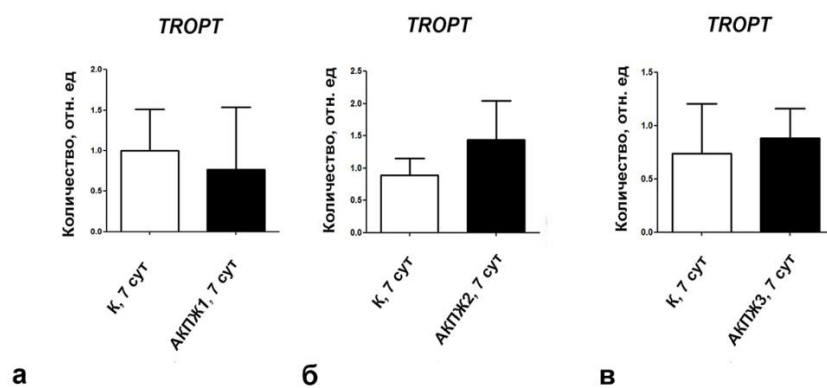


Рис. 10. Экспрессия тропонина Т на 7 сутки кардиодифференцировки иПСК от пациентов с АКПЖ и контрольных линий иПСК.

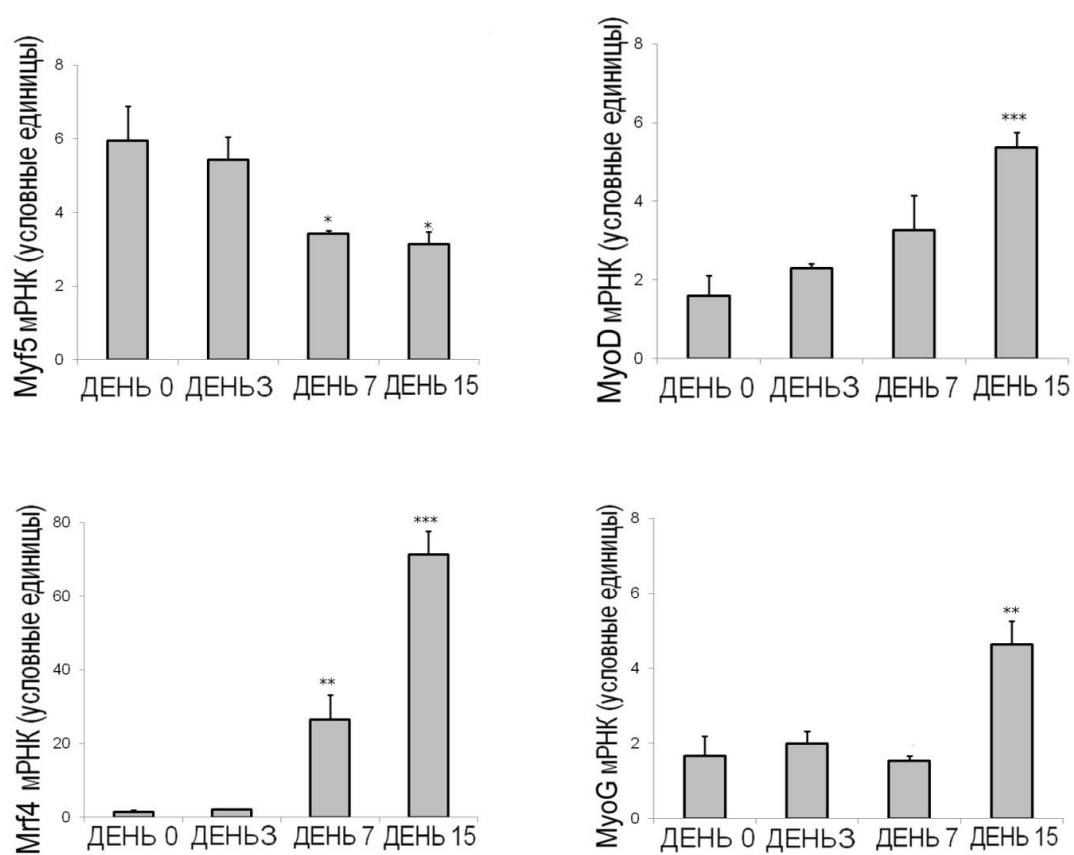


Рисунок 11. Динамика экспрессии маркеров миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в клетках линии C2C12. * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,004$. $n = 3$.

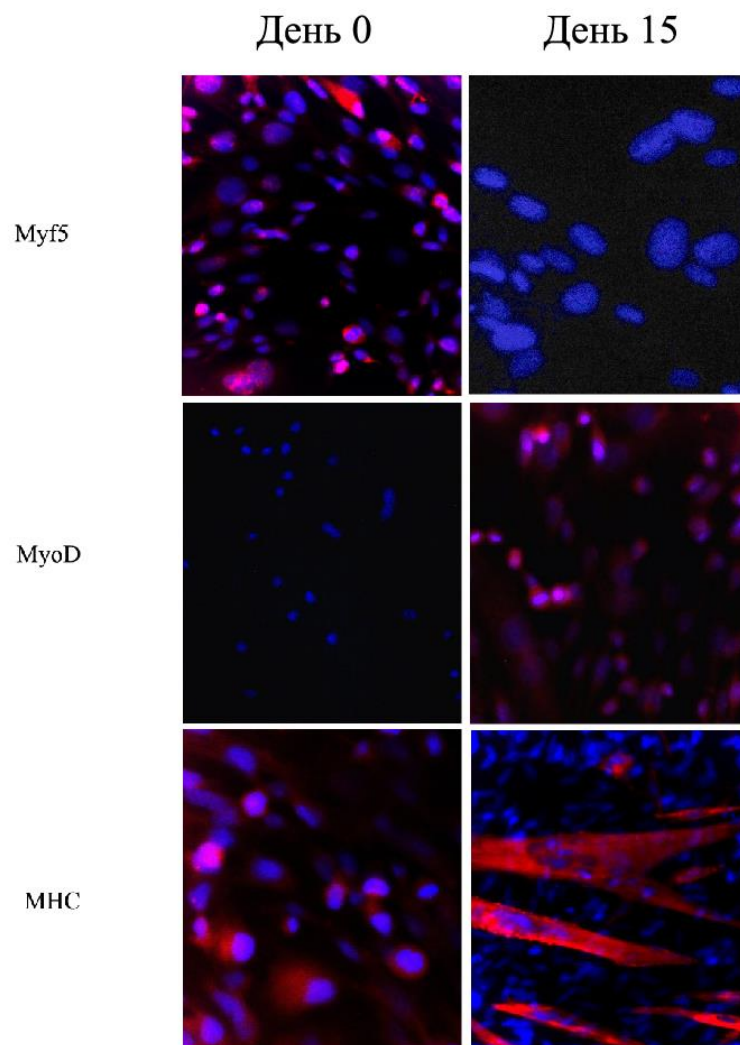


Рис.12. Иммуноцитохимический анализ маркеров/регуляторов миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в C2C12; увеличение 200х.

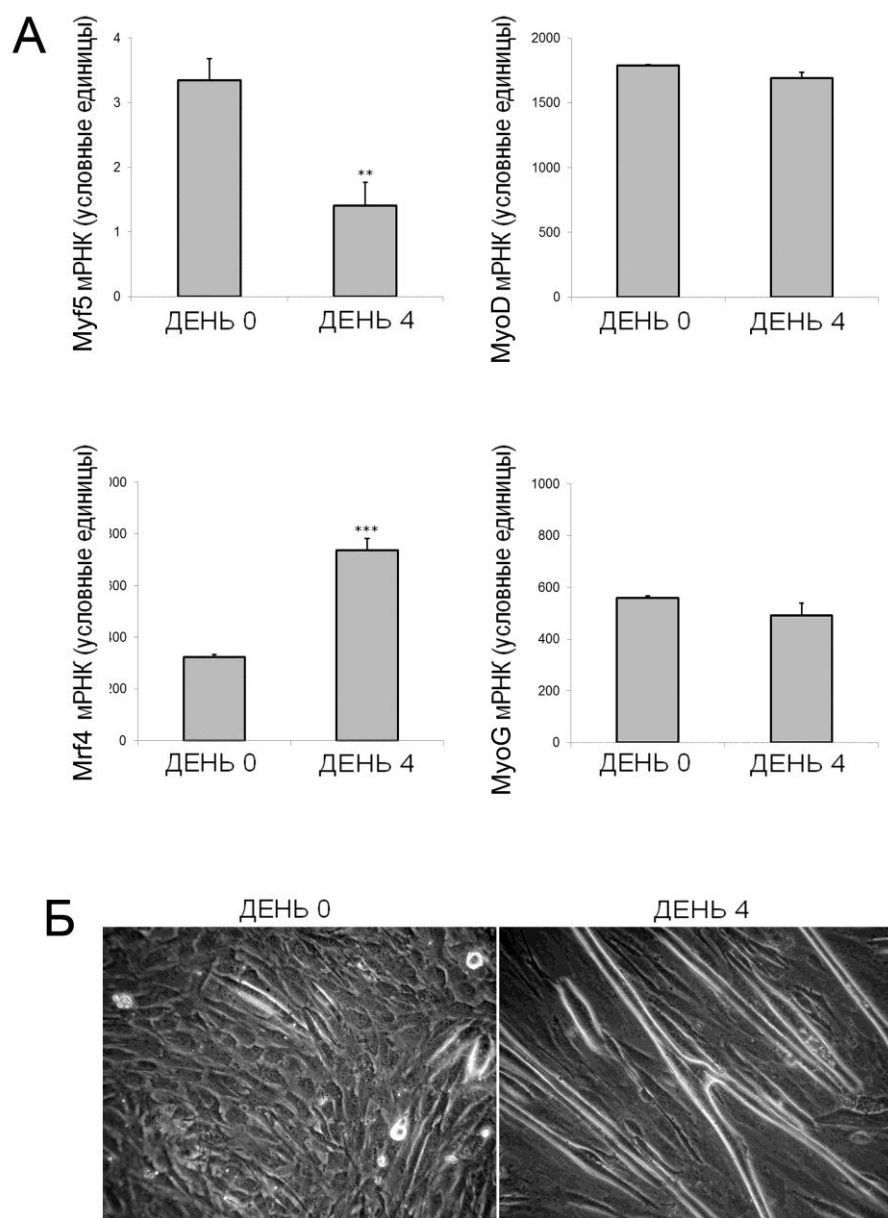


Рис.12. (А) Динамика экспрессии маркеров миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в СТ. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0002$. $n=3-4$; (Б) Морфология СК (левая панель) до стимуляции миогенеза (Б) и после 4-х дней стимуляции миогенеза (правая панель).

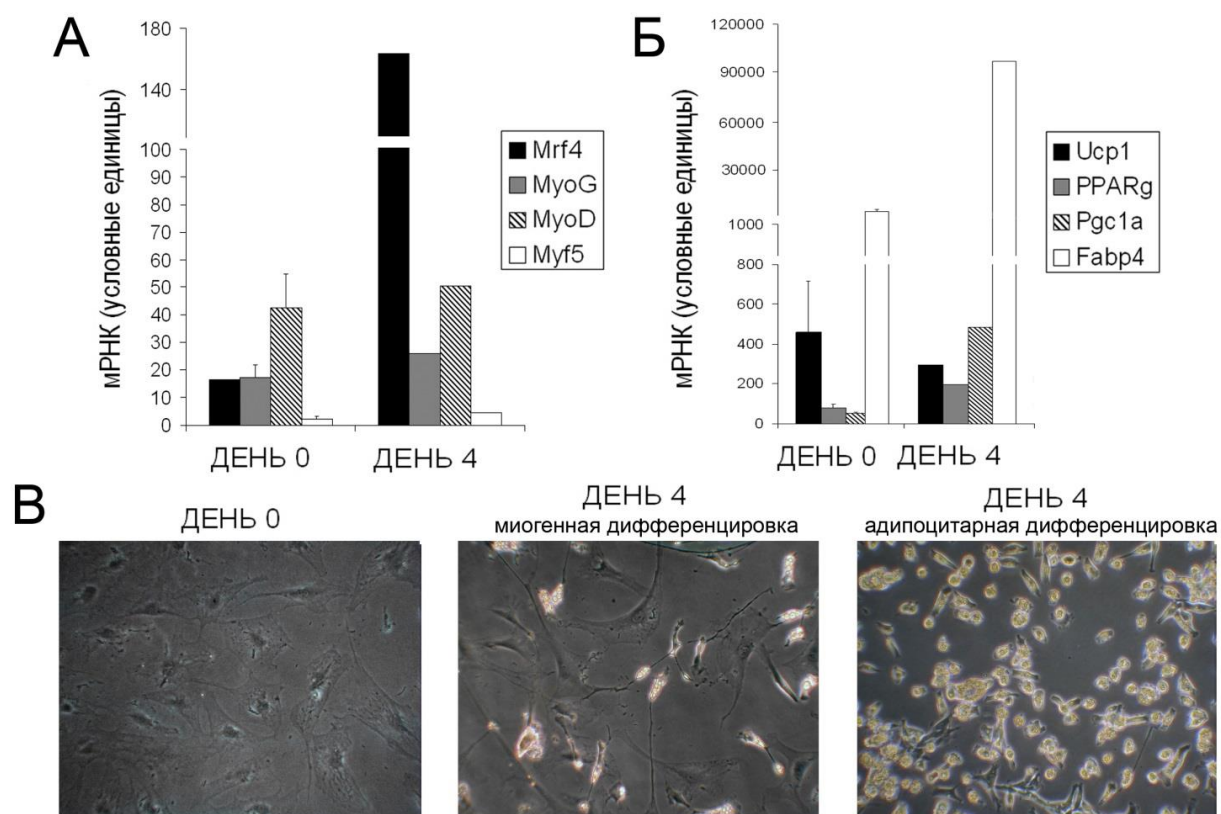


Рис.13.(А) Динамика экспрессии миогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в ФАК в течение 4 дней (n=3; некоторые образцы были объединены перед проведением Q-PCR в связи с ограниченным количеством клеточного материала); (Б) Динамика экспрессии адипогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в ФАК в течение 4 дней (n=3; некоторые образцы были объединены перед проведением Q-PCR в связи с ограниченным количеством клеточного материала); (В) Морфология ФАК (левая панель) после 4-х дней стимуляции миогенеза (центр) и адипогенеза (правая панель).

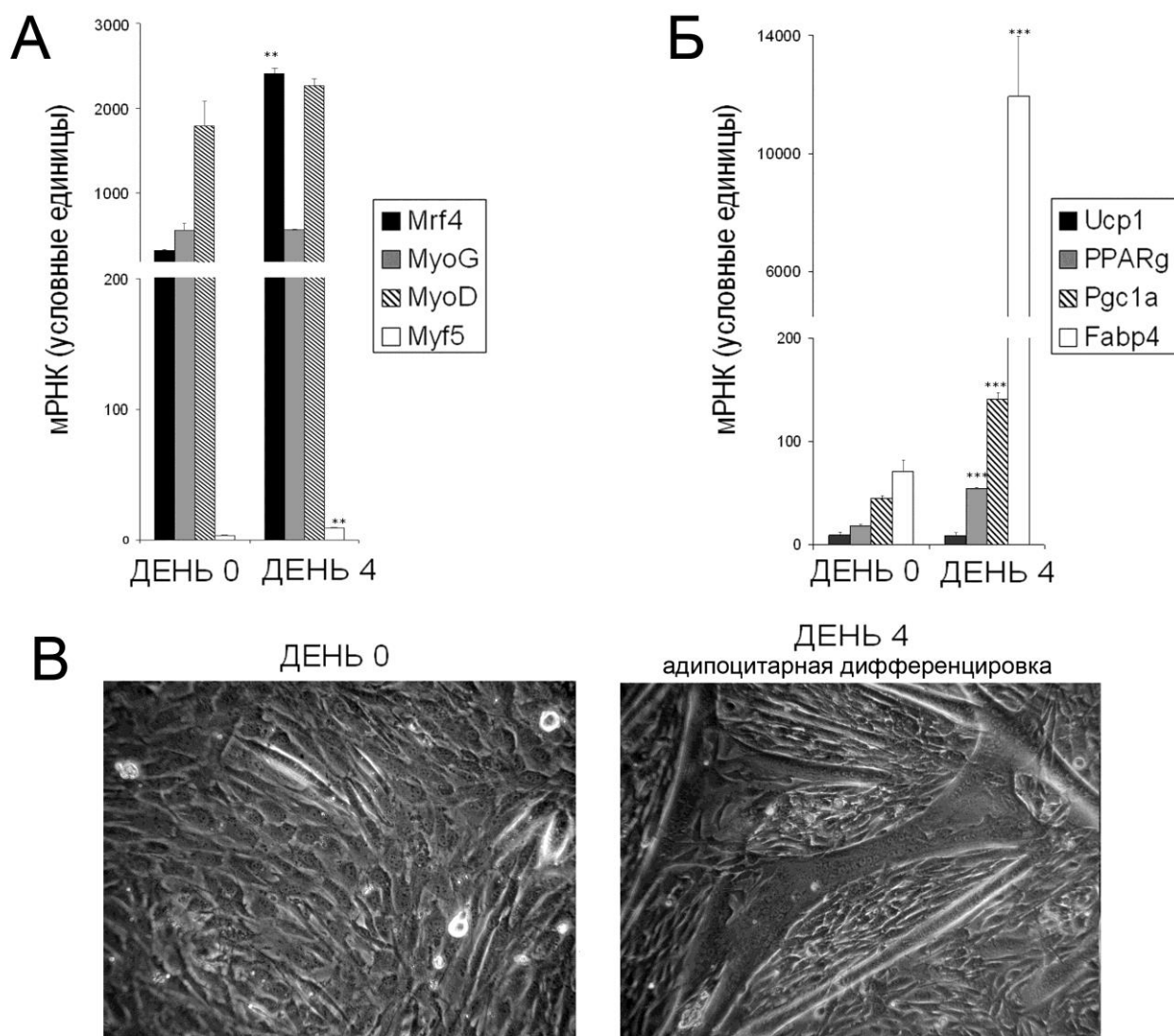


Рис.14. (А) Динамика экспрессии миогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в СТ в течение 4 дней ($n=3$; $**p<0,001$); (Б) Динамика экспрессии адипогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в СТ в течение 4 дней ($n=3$; $***p<0,001$); (В) Морфология СТ до стимуляции адипогенеза (левая панель) и после 4-х дней стимуляции(правая панель).

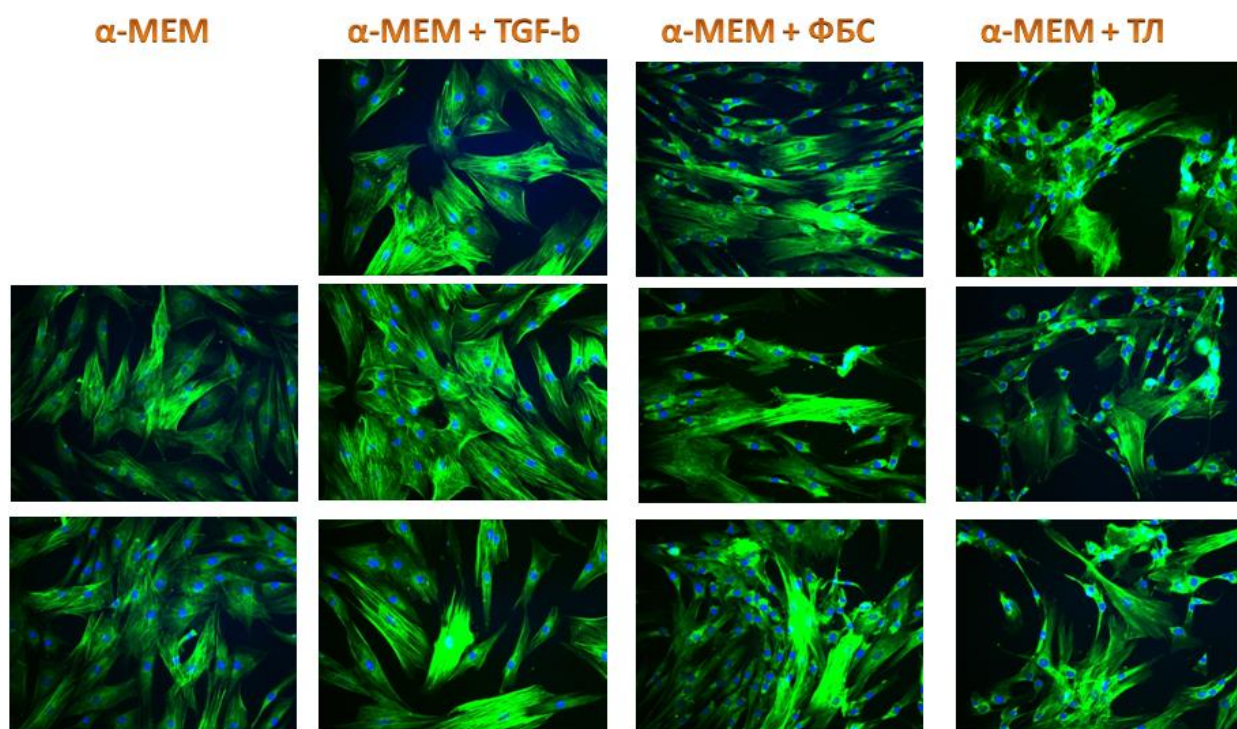


Рис. 15. Характер распределения гладкомышечного актина в культуре клеток МСК в различных условиях.