

На правах рукописи

БЕЙЛИН Аркадий Константинович

**МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ОСОБЕННОСТЕЙ КОЖИ ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМ
БУЛЛЕЗНЫМ ЭПИДЕРМОЛИЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАЦИЕНТ-
СПЕЦИФИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Специальность 1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2021

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, чл.-корр. РАН
ВОРОТЕЛЯК Екатерина Андреевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ГРИВЕННИКОВ Игорь Анатольевич,
главный научный сотрудник лаборатории
молекулярной нейрогенетики и врожденного
иммунитета Федерального государственного
бюджетного учреждения Институт
молекулярной генетики Национального
исследовательского центра "Курчатовский
институт" (г. Москва)

доктор биологических наук, профессор
ЕГОРОВ Егор Евгеньевич,
ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточных основ развития злокачественных
заболеваний Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (г. Москва)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук (г. Санкт-
Петербург)

Защита состоится «20» октября 2021 г. в 14.00 часов на заседании
диссертационного совета 24.1.036.02 в Институте биологии развития им. Н.К.
Кольцова РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН: <http://idbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Кузнецова А.В.
avkuzn@idbras.ru

Общая характеристика работы

Актуальность темы, степень ее разработанности

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) – это группа тяжелых наследственных генодерматозов. Лечение ВБЭ в настоящее время носит лишь симптоматический характер. В то же время генетический характер заболеваний и современное развитие генно-инженерных и клеточных технологий требует от исследователей в области регенеративной медицины разработки современных модельных систем для изучения патогенеза и создания методов специфического воздействия на мутации. Это свидетельствует об актуальности и фундаментальной значимости проблемы, лежащей в основе исследования, и подходов к изучению механизмов ВБЭ на основе клеточного моделирования.

В России молекулярно-генетический анализ мутаций, определяющих развитие ВБЭ, проводится мало, нет официальной статистики по распространенности разных типов заболевания, в то время как на фоне общей гетерогенности популяций и этнического разнообразия существует, по всей видимости, обширное разнообразие генетических мутаций. В настоящее время во всем мире создаются базы данных, содержащие информацию о мутациях, их наследовании и патогенезе. Изучение особенностей мутационного разнообразия ВБЭ может существенным образом расширить имеющиеся мировые базы данных. Например, по данным исследования, проведенного в Краснодарском крае (Кубанова, 2011), частота встречаемости простых и дистрофических с полидиспластическими форм буллезного эпидермолиза за последние 10 лет увеличилась, в 2 и 7 раз, соответственно, в сравнении с данными предыдущих исследований, что, однако, может быть связано с улучшением учета пациентов и диагностики.

Основными методами диагностики ВБЭ являются иммунофлюоресцентное картирование антигенов и просвечивающая электронная микроскопия, определяющие основной поврежденный белок и уровень образования пузырей в коже. Однако быстрое развитие методов высокопроизводительного секвенирования позволяет надеяться на то, что в будущем генетический анализ с определением типа мутации, ее локализации и типа наследования станет доступным для медицинской практики не только за рубежом, но и на территории России. Из опубликованных данных (Vahidnezhad, 2018) известно, что в результате секвенирования может быть уточнен или даже изменен диагноз, например, в сложных случаях смешанных форм ВБЭ.

Помимо диагностики и развития методов функциональной терапии существует проблема недостаточной изученности клеточных механизмов, тех искажений в нормальном функционировании каскадов реакций в клетках, которые возникают в результате мутаций ВБЭ. Больные ВБЭ часто оказываются подвержены онкологическим заболеваниям кожи, для некоторых форм ВБЭ – это карцинома кожи, встречаются меланомы и плоскоклеточный рак. Для простой формы ВБЭ показана (Zurancic, 2017) связь между нарушениями в кератиновой сети и способностью клеток к апоптозу – мутации в генах кератинов приводят к искажению в ответе клетки на повреждения ДНК, активации в клетках

экспрессии анти-апоптотических генов. Для дистрофической формы ВБЭ влияние некоторых ключевых факторов в этом процессе лишь предполагается (Cohn, 2016), но еще не показано или изучено недостаточно, в частности активация TGF- β сигнального пути. Больные с этим типом заболевания имеют наиболее тяжелые клинические проявления и часто страдают от возникновения плоскоклеточного рака кожи. Молекулярные механизмы, приводящие к предрасположенности клеток к онкологической трансформации, также недостаточно изучены.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось создание новых клеточных моделей ВБЭ, воспроизводящих основные структурно-функциональные особенности кожи пациентов с ВБЭ, что необходимо для разработки новых подходов к лечению, в частности с использованием редактирования генома клеток пациентов.

Задачи:

1. Разработать и охарактеризовать модель простого буллезного эпидермолиза (ПБЭ) на базе клеточной линии HaCaT с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

2. Получить и провести характеристику первичных культур фибробластов и кератиноцитов от пациентов с дистрофическим буллезным эпидермолизом (ДБЭ).

3. Охарактеризовать полученные иммортализованные линии фибробластов и кератиноцитов в качестве модельных объектов.

4. Создать и охарактеризовать трехмерные модели кожи на основе полученных иммортализованных линий кератиноцитов и фибробластов и подтвердить воспроизведение структурно-функциональных особенностей кожи ДБЭ.

Научная новизна полученных результатов

Была получена и охарактеризована новая модель ПБЭ на базе клеточной линии HaCaT с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Получены и охарактеризованы новые клеточные линии от пациентов с ДБЭ, несущие уникальные мутации. Были охарактеризованы новые иммортализованные линии кератиноцитов, полученные с помощью новых методов иммортализации, которые позволили сохранить свойства клеток близкими к первичным, что позволит использовать данные клеточные линии как замену первичным кератиноцитам в модельных системах. Были получены новые трехмерные модели кожи, моделирующие ВБЭ, в том числе из иммортализованных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе модели ВБЭ позволяют обойти ограничения и недостатки, связанные с первичными культурами клеток и животными моделями ВБЭ в контексте изучения механизмов заболевания и разработки новых видов терапии. На данных моделях возможно тестирование различных новых методов лечения ВБЭ, таких как воздействие низкомолекулярных веществ,

ретровирусной терапии, терапии с использованием аденоассоциированных вирусов, генетического редактирования, транс-сплайсинга РНК.

Полученные клеточные линии с возможностью к обратимой иммортализации могут быть использованы в качестве альтернативы индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам для генетической модификации и создания клеточного продукта для аутологичной трансплантации, что ранее было применено для клеток предшественников миобластов.

Личный вклад автора

Культивирование клеток HaCaT, проведение процедуры редактирования и селекция мутантных клонов проводились совместно с Евтушенко Н.А. Эксперименты с фосфатазой RTP1B проводились совместно с Петрусенко Ю.С. Анализ скорости заживления раны, МТТ-тест, эксперименты со стрессом сети кератинов и воздействием кофеина, иммуноцитохимическая окраска и микроскопия клеток HaCaT проводились лично автором.

Иммунофлуоресцентный анализ (криотомия, окраска и микроскопия) биопсий кожи пациентов и здоровых доноров производился лично автором.

Выделение культур первичных дермальных фибробластов и кератиноцитов, селекция и культивирование иммортализованных клеток после трансдукции проводились совместно с Евтушенко Н.А. Разработка протоколов культивирования и криоконсервации кератиноцитов была осуществлена лично автором. Анализ экспрессии маркеров, анализ морфологии клеток, определение контракционной активности клеток, количественный анализ активности SA- β -gal, анализ пролиферативной активности, клеточный сортинг и проточная цитометрия, микроскопия (световая, фазово-контрастная, флуоресцентная, конфокальная и цейтраферная съемка) осуществлялись лично автором.

Разработка протокола и получение эквивалентов кожи, а также иммунофлуоресцентный анализ (криотомия, окраска и микроскопия) осуществлялся лично автором. Иммуногистохимический анализ, классическая гистология и световая микроскопия эквивалентов кожи производились совместно с Риппой А.Л.

Трансплантация клеток в семенники мышей проводилась совместно с Роговой О.С., Косых А.В. и Гурской Н.Г. Иммунофлуоресцентный анализ опухолей (криотомия, окраска и микроскопия) осуществлялись лично автором.

Методы количественного анализа морфологии фибробластов и кератиноцитов на фазово-контрастных микроскопических изображениях и количественной оценки активности β -галактозидазы на световых микроскопических изображениях были разработаны лично автором. Анализ микроскопических изображений, статистический анализ данных и подготовка изображений осуществлялись лично автором.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием стандартизированных методик и протоколов, качественных реактивов и материалов. Все эксперименты проведены со всеми надлежащими техническими

контролями и биологическими повторами. Полученные данные обрабатывались соответствующими статистическими методами.

Основные материалы, изложенные в диссертации, были доложены и обсуждены на 8 конференциях: вторая международная конференция "Cell technologies at the edge: from research to practice" (CTERP) "Translational research in cell therapy", Москва, 13 апреля 2018 г.; международная (XXII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, Москва, 15 марта 2018 г.; Международный конгресс CRISPR-2018. Новосибирск, 10–14 сентября 2018 г.; Cold Spring Harbor Laboratory Meetings& Courses Program, Genome engineering: the CRISPR-Cas revolution, Нью-Йорк, США, 22-25 августа 2018 г.; 44th FEBS Congress, Краков, Польша, 6–11 июля 2019 г.; ESDR 2019 Annual Meeting, Бордо, Франция, 18 - 21 сентября 2019 г.; II объединенный научный форум VI съезд физиологов СНГ VI съезд биохимиков России IX российский симпозиум «белки и пептиды», Сочи, 1–6 октября 2019 г.; European Biotechnology Congress 2019, Прага, Чехия, 15 ноября 2019 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования (WoS, Scopus) и соответствуют Перечню ВАК, тезисов докладов и материалов конференций 8.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 131 странице, содержит 32 рисунка, 3 таблицы и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Библиография включает 246 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для внесения мутаций в ген *krt5* линии клеток HaCaT использовали систему редактирования генома CRISPR/Cas9, включающую молекулярное клонирование, ПЦР, трансфекцию, клеточный сортинг, клонирование клеток, T7E1 анализ, секвенирование. Для характеристики первичных и иммортализованных клеточных линий кератиноцитов и фибробластов использовали методы секвенирования, ПЦР, прижизненной фазово-контрастной микроскопии, иммунного окрашивания клеток и тканей, криотомии, классической гистологической окраски, светлостойкой микроскопии, флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии, цитраферной съемки, проточной цитометрии, цитогенетического анализа, STR-типирования, функционального анализа (осмотический и тепловой стрессы, ранозаживление, контракция коллагенового геля, стратификация в составе трехмерного эквивалента кожи, активность β -галактозидазы, опухолеобразование, скорость пролиферации) и компьютерной обработкой полученных изображений с помощью программного пакета Fiji с дальнейшей статистической обработкой полученных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и анализ модели буллезного эпидермолиза простого типа на базе линии иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9

Для создания модели ПБЭ было решено внести мутации в экзон 7 гена *krt5* в линии клеток HaCaT. После осуществления процедуры редактирования было проведено исследование мутаций в полученных клонах, а также исследованы проявления данных мутаций, характерные для кератиноцитов ПБЭ в культуре.

Из полученных библиотек клонов было выделено две линии: 2B4 содержала инсерцию в 19 п.н. за 2 кодона перед областью TYRKLLEGE; D7 являлась смешанной популяцией, состоящей из нескольких клонов. Среди них варианты, несущие инсерцию длиной 5 нуклеотидов и 1 нуклеотид в 7 экзоне гена *krt5*.

Обе линии демонстрировали агрегацию K5 в нормальных условиях культивирования (Рис. 1), а D7 также демонстрировал ускоренную миграцию в модели раны, что согласуется с данными относительно кератиноцитов с тяжелыми формами ПБЭ (Letai, 1993; Morley, 2003) и может быть следствием известной активации стресс-активируемых киназных путей в этих клетках.

Ингибирование киназ кофеином и связывание субстрата мутантной фосфотазой РТР1В привело к уменьшению количества агрегатов и снижению экспрессии K5. Так как фосфорилирование предотвращает убиквитинирование кератина, возможно, что снятие локального фосфорилирования, как защитного механизма, способствовало ускоренной деградации белка, вследствие чего экспрессия кератина могла быть снижена.

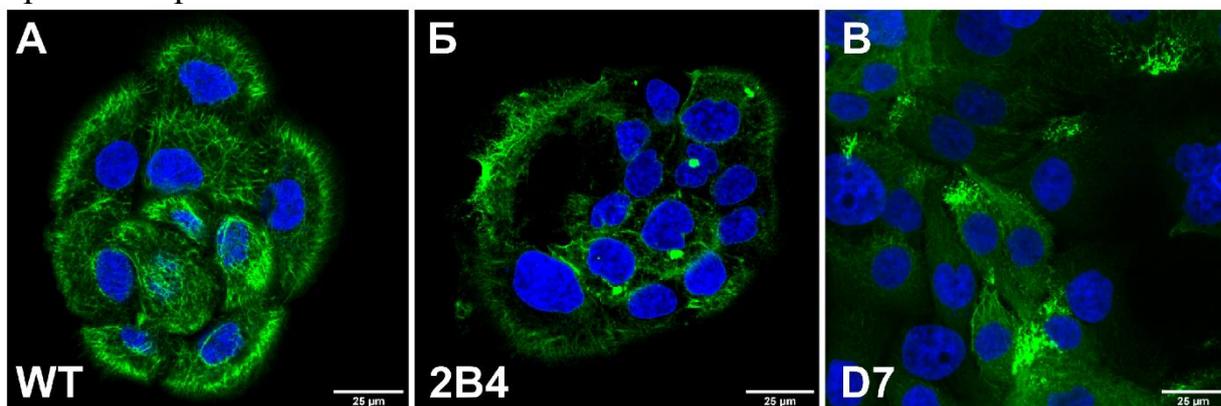


Рисунок 1. Иммуноцитохимическая окраска клеток HaCaT антителами против кератина 5 (зеленый) и DAPI (синий). WT - клетки HaCaT «дикого типа». 2B4 и D7 - мутантные клоны HaCaT. Конфокальная микроскопия.

2. Характеристика пациентов с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом

В работе использовали клетки от 4 пациентов с РДБЭ (д1-д4). Для них были определены мутации и подтип заболевания (Табл. 1), а также выявлено нарушение распределения коллагена VII типа (C7) в коже (Рис. 2). Также в работе использовали клетки от 6 здоровых доноров (ФЗК1, иммФЗК1, ФЗК2, иммФЗК2, ФЗК3, ФЗК4, ФЗК5, КЗК5, иммКЗК5, КЗК8, иммКЗК8).

Таблица 1. Список пациентов с РДБЭ: пол, возраст, пациент-специфические клеточные линии, мутации, выявленные в гене *col7a1*, и подтип РДБЭ.

Пациент	Форма РДБЭ	Пол/ Возраст	Клеточные линии	Мутация 1	Мутация 2
д1 РДБЭ	генерализованный тяжелый ОРРНА 79408	М/8	ФЭБ1 иммФЭБ1 КЭБ1 иммКЭБ1	с.425А > G (p.K142R)	с.425А > G (p.K142R)
д2 РДБЭ	инвертированный ОРРНА 79409	М/16	ФЭБ2 иммФЭБ2 КЭБ2 иммКЭБ2	с.682 + 1G > А	с.6205 С > Т (p.R2069C)
д3* РДБЭ	генерализованный тяжелый ОРРНА 79408	М/5	ФЭБ3 иммФЭБ3 КЭБ3 иммКЭБ3	с.8245G > А (p.G2749R)	с.8245G > А (p.G2749R)
д4 РДБЭ	генерализованный умеренный ОРРНА 89842	М/21	ФЭБ4 иммФЭБ4	с.520G > А (p.G174R)	нет данных

*—Пробанд имел гетерозиготную мутацию с.1054С > Т (p.R352C) в гене *krt5*.

3. Оценка иммортализации первичных кератиноцитов и фибробластов

Иммортализация линий ФЭБ и ФЗК, а также КЗК5, была достигнута за счет стабильной экспрессии кДНК hTERT. КЭБ и КЗК8 были иммортализованы сверхэкспрессией hTERT и VMI-1.

Иммортализация была подтверждена иммуноцитохимической окраской.

4. Характеристика первичных и иммортализованных фибробластов, полученных от пациентов с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом

4.1. Анализ экспрессии маркеров фибробластами

Микоплазмы и кросс-контаминации по данным тестов на микоплазму и STR-профилирования культур не было обнаружено. Цитогенетическое исследование подтвердило отсутствие хромосомных aberrаций после 10 пассажей.

Для установления природы клеток и выявления различий здоровые и РДБЭ фибробласты проанализировали на экспрессию маркеров фибробластов: S100A4, трансгелина, коллагена IV типа, коллагена I типа, фибронектина, альфа-гладкомышечного актина (α -SMA), сегмента ED-A фибронектина (FN ED-A) и

C7. Клетки демонстрировали одинаковую экспрессию маркеров, за исключением C7, α -SMA и FN ED-A.

Метод полуколичественного сравнения данных ИЦХ применили для сравнения уровней экспрессии C7, α SMA и FN ED-A. Интенсивность окрашивания для C7 измеряли для ФЭБ (1–3) и ФЗК (1–4). Средние значения этих групп сравнивали с помощью вложенного t-теста. Результаты показывают, что клетки ФЭБ имеют сниженную интенсивность окрашивания C7 по сравнению с клетками ФЗК ($p < 0,001$). Интенсивность окрашивания для α -SMA и FN ED-A измеряли для ФЭБ (1–4) и ФЗК1. Образцы сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки. Уровни экспрессии α -SMA и FN ED-A каждой линии ФЭБ были значимо ($p < 0,05$) выше, чем у ФЗК.

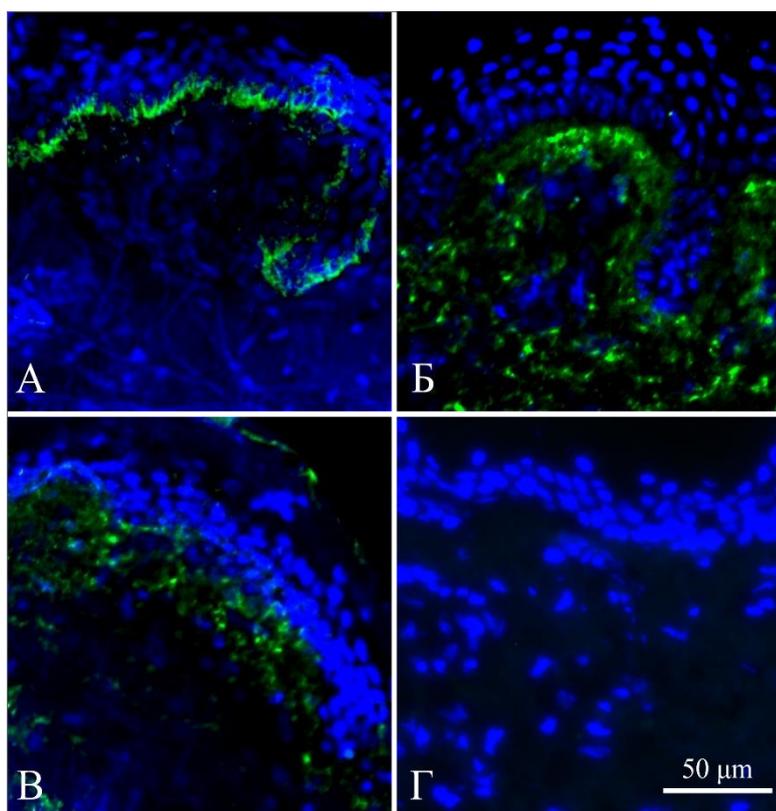


Рисунок 2.

Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов кожи. (А) Кожа здорового донора дб. (Б) Кожа пациента д2 с инвертированным РДБЭ. (В) Кожа пациента д3 с генерализованным тяжелым РДБЭ. (Г) Отрицательный контроль вторичных антител на срезе кожи. Зеленый канал - коллаген VII типа. Синий канал - ДНК (DAPI). Флуоресцентная микроскопия.

4.2. Анализ морфологии фибробластов

Мы предположили, что состояние РДБЭ и иммортализация могут отразиться на морфологии фибробластов в культуре. Для проверки гипотезы был произведен комплексный количественный анализ ряда морфологических параметров.

Все первичные дермальные фибробласты имели нормальную веретенообразную морфологию. Для морфологического анализа измеряли от 43 до 127 клеток у каждой клеточной линии. Для сравнения ФЭБ и ФЗК использовали комбинированные данные морфологии из ФЭБ (1–4) и ФЗК1. Морфологические параметры сравнивали с помощью двухвыборочного t-теста. Данные проточной цитометрии с прямым рассеянием и боковым рассеянием сравнивали с помощью сравнения хи-квадрат FlowJo. ФЗК1 сравнивали с

дубликатами ФЭБ (1–4). Фоновый уровень T (x) был получен сравнением ФЗК1 с повтором ФЗК1 плюс ФЗК3 в двух экземплярах. Результаты показали, что ФЭБ в среднем имеют большую площадь, периметр, минимальную ось вписанного эллипса и минимальный диаметр, измеренный штангенциркулем. Кроме того, клетки ФЭБ оказались менее кругообразными и компактными. Не было обнаружено значимых различий в боковом светорассеянии (SSC) между комбинированными ФЭБ и ФЗК, но сравнение прямого светорассеяния (FSC) показало, что клетки ФЭБ в среднем больше чем ФЗК ($T(x) = 868$, фоновый уровень $T(x) = 215$).

Аналогичным образом было исследовано влияние иммортализации на морфологию фибробластов. Несмотря на то, что некоторые клеточные линии демонстрируют различия в некоторых морфологических параметрах, нет четкой зависимости ни по одному параметру между морфологией и иммортализацией, поэтому можно сказать, что иммортализация не оказывает значительного влияния на морфологию фибробластов и сохраняет различия между ФЭБ и ФЗК.

4.3. Анализ контракции коллагенового геля фибробластами

Было сделано предположение, что нарушение C7 приведет к изменению активности перестройки ВКМ фибробластами. Для проверки данной гипотезы был поставлен тест на скорость контракции коллагенового гидрогеля.

Контракцию четырех коллагеновых гелей измеряли для каждой линии ФЭБ (1, 2, 3 и 4), иммФЭБ (1, 2, 3 и 4) и ФЗК1. Данные первичных клеток были объединены в две группы (ФЭБ и ФЗК) и сравнены с помощью теста Манна-Уитни. Было показано, что вызванная фибробластами контракция коллагена значимо выше в клетках ФЭБ по сравнению с клеточными линиями ФЗК ($p < 0,05$). Сравнение с помощью теста Манна-Уитни первичных и иммортализованных клеток не показало значимых различий между ними в индуцированной фибробластами контракции коллагенового геля.

4.4. Анализ окрашивания фибробластов на ассоциированную со старением активность β -галактозидазы

Для анализа влияния иммортализации на старение фибробластов первичные и иммортализованные пары фибробластов окрашивали X-gal для сравнения в них активности связанной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal). Результаты показывают, что после иммортализации интенсивность окрашивания фибробластов становится ближе к первичным фибробластам от молодого донора и в большинстве случаев значимо ниже, чем в парных первичных клетках (Рис. 3).

4.5. Анализ последствий Cre-опосредованного удаления трансгенов

Присутствие пары повторов LoxP в использованных для иммортализации ленти-плазмидах позволяет применять Cre-опосредованную сайт-направленную рекомбинацию для вырезания окруженной повторами вставки, то есть VM1-1, hTERT, а идущий за LoxP повторами флуоресцентный белок с ядерной локализацией TurboFP635NLS является индикатором прохождения рекомбинации.

Чтобы проверить различия в экспрессии TurboFP635NLS в клетках до и после Cre-опосредованной рекомбинации, использовали временную трансфекцию этих клеток плазмидой pCre-eGFP. Популяция клеток с красными флуоресцентными ядрами появилась через сутки после трансфекции и стала доминирующей через несколько дней.

Мы проверили старение клеток после удаления кассеты hTERT, сравнив их с первичными клетками. Чтобы получить более надежную и точную оценку старения, окрашивание на SA- β -gal было дополнено ИЦХ окраской на ki67. Эксперимент проводили на клетках иммФЭБ1 и иммФЭБ4 до и после трансфекции плазмидой, кодирующей рекомбиназу Cre. Была показана повышенная интенсивность окрашивания SA- β -gal в клетках, трансфицированных Cre, которые получили визуальное свидетельство нокаута hTERT - появление красных флуоресцентных ядер после трансфекции.

Процент клеток с красными флуоресцентными ядрами был подсчитан после нескольких раундов трансфекции Cre и составил 41% для иммФЭБ1 и 13% для иммФЭБ4. Пролиферацию иммФЭБ с красными флуоресцентными ядрами оценивали на основании окрашивания ИЦХ против ki67. ИммФЭБ1 и иммФЭБ4 с красными флуоресцентными ядрами показали сниженную пролиферацию по сравнению с ФЭБ и иммФЭБ без трансфекции Cre. Количество пассажей было 15 - для линии ФЭБ и 30 - для иммФЭБ, как с трансфекцией Cre, так и без нее.

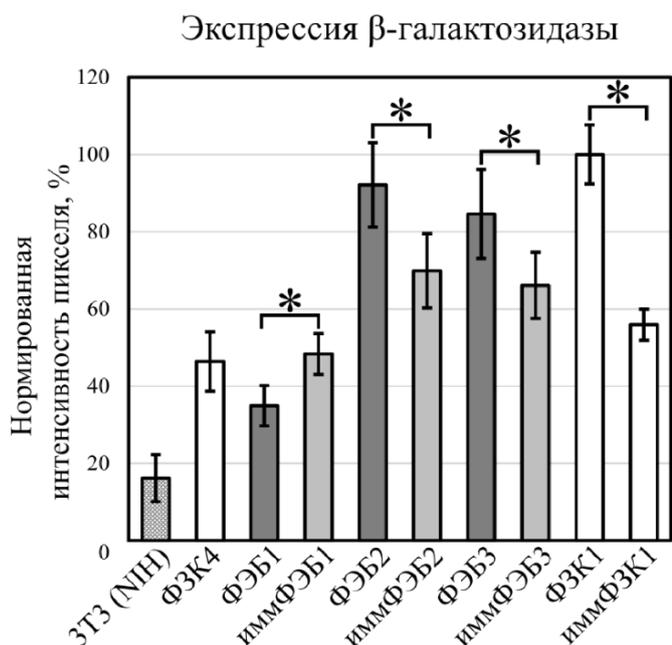


Рисунок 3. Окрашивание фибробластов на активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal). Наиболее интенсивно окрашенные клетки принимали за 100%. Звездочки (*) указывают на значимую разницу ($p < 0,05$) между первичными и иммортализованными клеточными линиями при сравнении с использованием критерия Манна-Уитни. Среднее значение нормализованной интенсивности окрашивания и 95% доверительный интервал приведены для каждой клеточной линии. 3T3 (NIH) - положительный контроль.

5. Характеристика первичных и иммортализованных кератиноцитов полученных от пациентов с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом

5.1. Характеристика линий кератиноцитов

Все культуры первичных кератиноцитов были проверены на наличие микоплазмы, и было выполнено STR профилирование. Микоплазмы и кросс-контаминации не было обнаружено. Цитогенетическое исследование

подтвердило отсутствие хромосомных aberrаций после 10 пассажей у всех линий, кроме иммКЗК5.

В результате цитогенетического исследования в 100% клеток иммКЗК5 выявлен гипердиплоидный набор хромосом (модальное число хромосом 55–69) с множественными хромосомными аномалиями: дупликацией участков p31-p32, p12-p36, q25-q44 1-ой хромосомы, делеции участков q23-qter длинного плеча 3-ей хромосомы и q31-qter длинного плеча 7-ой хромосомы, дополнительные материалы неизвестного происхождения на p-плече 4-ой хромосомы и на q-плече 13-ой хромосомы, от 4-х до 8-и маркерных хромосом. Также, как и у других иммортализованных линий кератиноцитов, таких как NM1 и NIKs, у данной клеточной линии наблюдается трисомия 8 хромосомы (у HaCaT тетрасомия), увеличение числа генов которой, предположительно, ответственно за спонтанную иммортализацию кератиноцитов.

5.2. Анализ экспрессии маркеров кератиноцитами

В связи с аномалиями хромосомного состава была изучена экспрессия маркеров кератиноцитов линией иммКЗК5.

В результате ИЦХ окрашивания иммКЗК5 была выявлена экспрессия маркера базальных кератиноцитов – K14, причем в паттерне экспрессии K14 практически отсутствует сеть филаментов. Также клетки показывают отрицательную окраску по K5. Ранее сообщалось, что экспрессия этих кератинов является маркером онкотрансформации и оба кератина являются активными участниками сохранения способности к активной пролиферации, поэтому пути, способствующие трансформации полученных клеток еще предстоит выяснить в последующих работах. Клетки также имеют негативное окрашивание по K10 и транскрипционному фактору p63.

5.3. Анализ морфологии кератиноцитов

Также, как и для фибробластов была выдвинута гипотеза, что состояние РДБЭ и иммортализация могут оказать влияние на морфологию кератиноцитов в культуре. В связи с чем, был проведен комплексный анализ морфологии клеток.

КЗК5 перед процедурой иммортализации имели типичную для кератиноцитов морфологию “бульжной мостовой”. После лентивирусной трансдукции и селективного отбора в среде с антибиотиком в культуре появилась популяция клеток с измененной морфологией, они были меньше в диаметре, имели округлую форму и формировали небольшое число крупных отростков.

После образования монослоя иммКЗК5 демонстрировали отсутствие контактного торможения. После нескольких пассажей данные клетки полностью вытеснили другие кератиноциты, образовав морфологически гомогенную популяцию, сохранившуюся на протяжении более 20 пассажей. В среде DMEM/F12 с сывороткой, содержащей более высокую концентрацию ионов кальция, чем среда SnT-07, используемая на первых этапах работы, произошло изменение морфологии и особенностей роста: клетки стали более распластанными, при этом, несмотря на продолжающийся рост, не образовывали

монослоя, оставляя промежутки между островками клеток соединенными перешейками, а также обладали пониженной адгезией к пластику.

Мы исследовали влияние иммортализации на морфологию кератиноцитов КЭБ1, КЭБ2 и КЗК8 от доноров д1, д2 и д12 соответственно. Для морфологического анализа было измерено от 193 до 455 клеток из каждой клеточной линии. Морфологические параметры первичных и иммортализованных клеток от одних и тех же доноров сравнивали с помощью двухвыборочного t-критерия. Данные проточной цитометрии FSC и SSC сравнивали с помощью критерия хи-квадрат FlowJo. На момент эксперимента иммортализованные клетки прошли на 12-18 пассажей больше, чем первичные.

Статистически значимых различий по каким-либо морфологическим параметрам между линиями кератиноцитов при анализе морфологии в 2D культуре на фазово-контрастных изображениях не обнаружено. Данные проточной цитометрии показали, что во всех трех случаях иммортализованные клетки были немного меньше по FSC ($T(x) = 651-1253$, фоновый уровень $T(x) = 10-46$) и менее гранулярными по SSC ($T(x) = 463-1518$, фоновый уровень $T(x) = 4-29$), чем их первичные предшественники. Также было выявлено две популяции клеток по SSC в иммортализованных культурах и одна популяция в первичных культурах.

Сравнение РДБЭ кератиноцитов со здоровым контролем не выявило различий как для первичных, так и для иммортализованных клеток ($T(x) < 354$).

5.4. Анализ стратификации иммортализованных линий кератиноцитов *in vitro*

Для проверки влияния иммортализации на способность кератиноцитов к дифференцировке, а также выявления различий между здоровым и РДБЭ эпидермисом, из полученных линий иммортализованных кератиноцитов были получены эквиваленты кожи по методике, разработанной ранее для первичных кератиноцитов.

При создании РЭ иммКЗК5 ведут себя схожим образом вне зависимости от используемой среды. Они образуют пласт, состоящий из 15–30 слоев клеток. Все клетки в пласте экспрессируют К14, а клетки в верхних слоях и отдельные клетки в толще экспрессируют К10 подобно клеткам НаСаТ. При этом наблюдается нормальная экспрессия С7 в районе базального слоя.

При реконструкции эпидермиса из иммКЭБ2 и иммКЗК8 в каждом случае был получен полностью стратифицированный эпидермис. Базальные и супрабазальные кератиноциты экспрессируют К14. Кератиноциты гранулярного слоя экспрессируют лорикрин и расположены рядом со слущивающимися клетками. Экспрессия плектина находится в основном вблизи базальной зоны. Окрашивание против С7 выявляет различия в уровне экспрессии. Линия иммКЭБ2 была получена из кератиноцитов кожи донора с инвертированной формой РДБЭ, для которых было показано остаточное количество белка С7 (Рис. 4).

5.5. Определение пролиферативно-возрастного статуса кератиноцитов

Скорость пролиферации и активность SA- β -gal еще одни из показателей трансформации и старения клеточных культур, поэтому полученные линии кератиноцитов сравнили по данным параметрам.

Было показано, что иммКЭБ1, иммКЗК8 и иммКЭБ2 имеют повышенную пролиферацию по сравнению с их первичным состоянием, что было показано с помощью EdU метки и проточной цитометрии. Скорость пролиферации иммортализованных клеток была на 20%, 16% и 13% выше для иммКЭБ1, иммКЭБ2 и иммКЗК8, соответственно, по сравнению с их первичными клетками.

Также провели окрашивание первичных и иммортализованных кератиноцитов на активность SA- β -gal. Для каждой клеточной линии было проанализировано более четырех тысяч клеток. Было показано, что иммКЭБ1, иммКЗК8 и иммКЭБ2 увеличили, уменьшили или не изменили интенсивность окрашивания по сравнению с соответствующими первичными клетками.

5.6. Анализ туморогенности иммортализованных кератиноцитов *in vivo*

Поскольку иммортализация работает с механизмами, часто задействованными в онкотрансформации, и для полученных иммортализованных линий кератиноцитов было показано изменение морфологии и скорости пролиферации, провели тест на способность иммортализованных кератиноцитов образовывать опухоли *in vivo*. Клетки трансплантировали в семенники иммунодефицитных мышей.

У всех трех мышей контрольной группы с трансплантатами контрольных опухолевых клеток HeLa в течение 3-4 недель после операции образовались опухоли. Размер яичек достигал 3,2 см в диаметре, первичный анализ тканей показал наличие кист с жидкостью. Кроме того, подтвердили наличие морфологических изменений в тканях семенников с помощью окрашивания гематоксилин-эозином. Окрашивание на ядра человека методом ИГХ доказало, что именно клетки HeLa образуют опухоли.

При трансплантации иммКЗК5 образовывали опухоли, в которых были обнаружены клетки, экспрессирующие теломеразу. Среди них присутствовали клетки, экспрессирующие K14 и K10, а также маркер поздней стратификации эпидермиса – лорикрин (Рис. 5). Также наблюдали большие тканевые образования без выраженных ядерных структур, но положительные при окраске антителами против материала ядер человека, что может быть следствием терминальной дифференцировки клеток в опухоли. Такая особенность в стратификации отмечалась исследователями ранее для спонтанно иммортализованной линии клеток кератиноцитов – HaCaT в условиях трансплантации иммунодефицитным мышам (Breitkreutz, 1998).

Семенники с трансплантатами клеток иммКЭБ2 собирали через 10 недель после операции. Обследование показало, что семенники имеют нормальные размеры. Анализ тканей также не выявил структурных изменений органов. Небольшое количество живых клеток трансплантата было обнаружено при окрашивании на ядра человека.

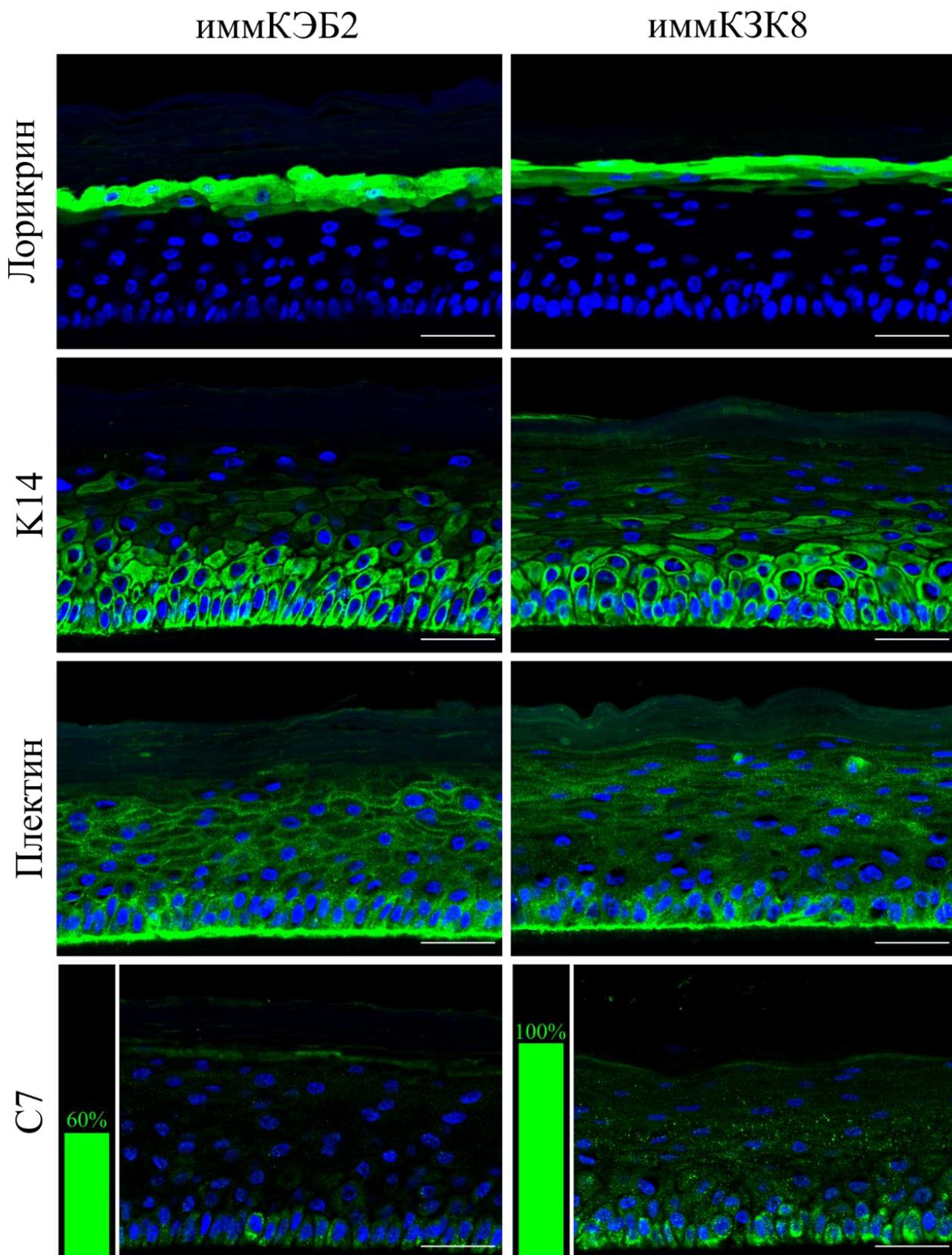


Рисунок 4. Иммуногистохимия реконструированного эпидермиса из иммКЭБ2 (инвертированный РДБЭ) и иммКЗК8. Ядра окрашены DAPI (синий). Маркеры (зеленые). Конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок - 50 мкм. Гистограмма показывает интенсивность окрашивания С7 в базальном слое иммКЭБ по сравнению с иммКЗК8.

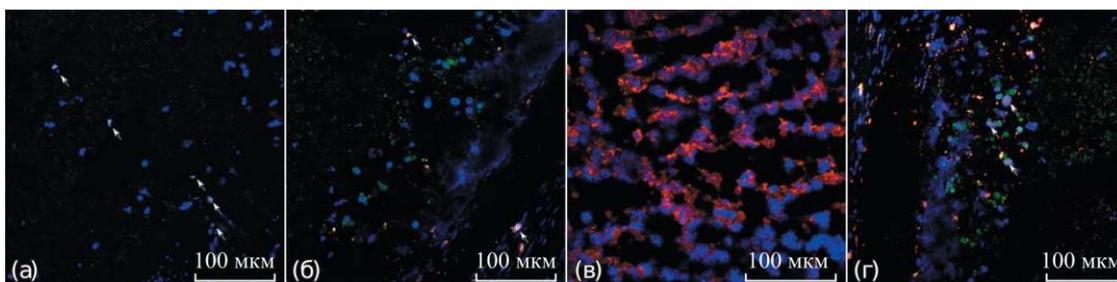


Рисунок 5. ИГХ исследование среза семенника мыши после трансплантации в него иммКЗК5. Конфокальная микроскопия. Синий – ДНК (DAPI). Зеленый – человеческие ядра. Красный – кератин 14 (а), кератин 10 (б), лорикрин (в), теломераза (г). Белые стрелки указывают на клетки с тройным окрашиванием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные мутантные линии HaCaT демонстрируют свойства кератиноцитов ПБЭ в культуре, что указывает на адекватность полученных линий HaCaT как модели ПБЭ. Разработанная модель позволит в дальнейшем продолжить изучение особенностей формирования кератиновых агрегатов, влияния стрессовых условий и различных фармацевтических препаратов на их распределение в клетке, применение системы CRISPR/Cas9 позволит провести генетическую терапию введенных мутаций. Установление детальной колокализации кератиновых промежуточных филаментов с RTP1B требует проведения новых экспериментов и использования микроскопии более высокого разрешения. Детализация потенциальных мишеней фосфорилирования в сети промежуточных филаментов K5 позволит приблизиться к пониманию роли сигнальных путей в ее формировании и реорганизации и, основываясь на этом, разработать возможный вариант лечения.

Были выявлены и подтверждены мутации четырех пациентов с РДБЭ. Полученные данные расширяют знания относительно распространенности мутаций в популяции, а также демонстрируют случаи комбинации нескольких мутаций в рамках одного генома, что демонстрирует важность исследования генома для установления причин заболевания.

Исследование выявило присутствие, в случае гомозиготной мутации с.425A>G, наличие последовательности РАМ рядом с областью мутации, что потенциально может быть использовано в разработке генной терапии данного типа мутаций с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

Как для фибробластов, так и для кератиноцитов полученных от пациентов с РДБЭ было показано значительное снижение экспрессии С7, но не полное его отсутствие. Тот факт, что на ИЦХ и в клеточных лизатах обнаруживались мишени связывания антител против наиболее иммунореактивной части С7 свидетельствует о том, что данные пациенты могут быть иммунотолерантны к введению здорового С7 в организм, что открывает широкие возможности относительно доступных для них вариантов терапии.

У фибробластов, полученных от пациентов с РДБЭ было обнаружено присутствие миофибробластов и черт характерных для стареющих клеток, что

указывает на наличие воспалительных и фиброзных процессов в коже. При этом признаков онкотрансформации обнаружено не было. Полученные данные указывают на вклад процессов воспаления и фиброза в приобретение фенотипа РДБЭ. Дальнейшие исследования данного направления могут открыть новые способы коррекции симптомов и улучшения состояния пациентов с РДБЭ не связанные напрямую с исправлением структурной составляющей заболевания.

Путем трансформации первичных кератиноцитов человека от здорового донора с помощью hTERT получена новая стабильная клеточная линия. Данная клеточная линия может стать ценным инструментом во многих исследованиях, связанных с изучением механизмов межклеточных взаимодействий, опухолеобразования и клеточной дифференцировки.

Получены новые стабильные клеточные линии из фибробластов и кератиноцитов полученных от пациентов с РДБЭ. Морфологические и функциональные тесты иммортализованных клеточных линий подтвердили фенотипы, сходные с фенотипами первичных клеток, для панелей фибробластов и кератиноцитов. Новые иммортализованные hTERT и VMI-1 линии кератиноцитов, как нормальные, так и РДБЭ, были способны образовывать *in vitro* многослойные стратифицированные эпидермальные эквиваленты с адекватным распределением маркеров дифференцировки. Новые иммортализованные панели клеточных линий полезны для замены первичных клеточных линий, тем самым представляя биологическую релевантную модель для исследования *in vitro* процессов, участвующих в развитии РДБЭ.

ВЫВОДЫ

1. Получена новая модель ПБЭ с мутациями в экзоне 7 гена *krt5*, демонстрирующая свойства кератиноцитов ПБЭ, а именно агрегацию кератиновой сети и ее зависимость от фосфорилирования, а также увеличение скорости миграции при застывании раны.

2. Получено 4 новых линии фибробластов и 2 линии кератиноцитов от пациентов с ВБЭ, для которых были выявлены мутации (в т.ч. новые) приводящие к фенотипу РДБЭ. Характеристика данных линий привела к обнаружению сниженной, но не отсутствующей экспрессии *C7* во всех линиях, а также фиброзного и стареющего фенотипа фибробластов без признаков онкотрансформации.

3. Подтверждена иммортализация новых линий кератиноцитов и фибробластов от пациентов с РДБЭ и здоровых доноров. Иммортализация фибробластов hTERT, а кератиноцитов hTERT и VMI-1 не оказывает существенного влияния на морфологию клеток и экспрессию клетками специфических белковых маркеров. Также не обнаружено приобретение данными клетками туморогенных свойств. Однако, иммортализация линии здоровых кератиноцитов hTERT привела к получению новой клеточной линии с множеством aberrаций хромосомного состава, измененными морфологией, экспрессией маркеров, ростом в культуре и составе РЭ, а также проявляющей туморогенные свойства.

4. Cre-опосредованное удаление hTERT в линиях immortalized фибробластов приводит к восстановлению в них части свойств первичных клеток.

5. Получена модель ороговевающего эпидермиса человека *in vitro* как из первичных кератиноцитов, так и из immortalized. При этом РЭ из кератиноцитов immortalized hTERT и BMI-1 не имел существенных отличий от РЭ из первичных клеток. РЭ из кератиноцитов РДБЭ демонстрировал пониженную экспрессию C7.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. **Бейлин А.К.**, Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А. Методы генной терапии для лечения врожденного буллезного эпидермолиза // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2018. Т. 73. № 4. С. 233-241. DOI: 10.3103/S0096392518040016

2. **Бейлин А.К.**, Гурская Н.Г., Евтушенко Н.А., Алпеева Е.В., Косых А.В., Терских В.В., Васильев А.В., Воротеляк Е.А. Иммунизация кератиноцитов человека с помощью каталитической субъединицы теломеразы // Доклады Российской Академии Наук. Науки О Жизни. – 2021. – Т. 496. – № 1. DOI: 10.31857/S2686738921010042

3. **Beilin A.K.**, Evtushenko N.A., Lukyanov D.K., Murashkin N.N., Ambarchian E.T., Pushkov A.A., Savostyanov K.V., Fisenko A.P., Rogovaya O.S., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Gurskaya, N.G. Signatures of dermal fibroblasts from RDEB pediatric patients // Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1792. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22041792>

4. Evtushenko N.A., **Beilin A.K.**, Dashinimaev E.B., Ziganshin R.H., Kosykh A.V., Perfilov M.M., Rippa A.L., Alpeeva E.V., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Gurskaya N.G. hTERT-driven immortalization of RDEB fibroblast and keratinocyte cell lines followed by Cre-mediated transgene elimination // Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(8), 3809. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22083809>

Список сокращений

ВБЭ — врожденный буллезный эпидермолиз; **ДБЭ** — дистрофический буллезный эпидермолиз; **ИГХ** — иммуногистохимия; **ИЦХ** — иммуноцитохимия; **К5,10, 14** — кератины 5,10 и 14; **КЗК/иммКЗК** — первичные/immortalized кератиноциты от здоровых пациентов; **КЭБ/иммКЭБ** — первичные/immortalized кератиноциты от пациентов с РДБЭ; **ФЗК/иммФЗК** — первичные/immortalized дермальные фибробласты от здоровых пациентов; **ФЭБ/иммФЭБ** — первичные/immortalized дермальные фибробласты от пациентов с РДБЭ — рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз; **ПБЭ** — простой буллезный эпидермолиз; **РДБЭ** — рецессивный дистрофический буллезный; **РЭ** — реконструированный эпидермис; **SA-β-gal** — senescence associated β-galactosidase (ассоциированная со старением β-галактозидаза); **C7** — collagen type VII (коллаген типа VII).