

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

© 2019 Е.В. Дементьева^{1,2,3*}, С.П. Медведев^{1,2,3,4}, В.Р. Коваленко^{1,2,3,4},
Ю.В. Вяткин^{4,5}, Е.И. Кретов², М.М. Слотвицкий⁶, Д.Н. Штокало⁵,
Е.А. Покушалов², С.М. Закиян^{1,2,3,4}

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: dementyeva@bionet.nsc.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, 630055 Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

⁵ ООО «Новые программные системы», 630090 Новосибирск, Россия

⁶ Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный Московской обл., Россия

Поступила в редакцию 07.10.2018

После доработки 25.11.2018

Принята к публикации 25.11.2018

Получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их последующая направленная дифференцировка в кардиомиоциты открывают новые возможности для изучения патогенеза наследственных сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из таких заболеваний является гипертрофическая кардиомиопатия, для которой до сих пор не разработано эффективных методов терапии. В данной работе подход, основанный на пациент-специфичных ИПСК, был применен для создания модели этого заболевания. Проведен генетический анализ пациента с гипертрофической кардиомиопатией, который выявил мутацию R326Q в гене *MYBPC3*. Получены и охарактеризованы ИПСК данного пациента. ИПСК пациента и здорового донора были дифференцированы в кардиомиоциты. Пациент-специфичные кардиомиоциты воспроизводили такие признаки гипертрофической кардиомиопатии, как нарушения в динамике потоков ионов кальция и их повышенное внутриклеточное содержание. Таким образом, кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки ИПСК пациента с гипертрофической кардиомиопатией, могут быть использованы в качестве модельной системы для изучения патогенеза данного заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, модели заболеваний человека, гипертрофическая кардиомиопатия, кардиомиоциты.

DOI: 10.1134/S0320972519030114

Принятые сокращения: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ACTC1 – кардиальный α -актин; α SMA – гладкомышечный α -актин; CAV3 – кавеолин 3; CHIR99021 – ингибитор протеинкиназы GSK3 β ; cTnT – кардиальный тропонин T; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; DNMT3B – ДНК-метилтрансфераза 3B; GLA – α -галактозидаза; GSK3 β – гликогенсинтаза киназа 3 β ; IWP2 – ингибитор WNT; KLF4 – Крюппель-подобный фактор 4; LAMP2 – ассоциированный с лизосомами мембранный белок 2; LEFTV – фактор левосторонней асимметрии; LIN28 – РНК-связывающий белок семейства LIN28; L-MYC – протоонкогенный белок MYCL; MLC2 – вентрикулярная форма регуляторной легкой цепи β -миозина; MYBPC3 – миозин-связывающий белок C; MYH7 – тяжелая цепь β -миозина; MYL2 – вентрикулярная форма регуляторной легкой цепи β -миозина; MYL3 – легкая цепь миозина; NANOG – транскрипционный фактор, содержащий гомеобокс; NF200 – нейрофиламент 200; NFAT – ядерный фактор активированных T-клеток; NODAL – лиганд белков суперсемейства TGF β ; OCT4 – транскрипционный фактор с гомеодоменом POU; PODXL – подокаликсинподобный белок; PRKAG2 – некаталитическая субъединица γ 2 АМФ-активируемой протеинкиназы; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; SOX2 – транскрипционный фактор семейства Sox (SRY-box 2); SSEA-4 – стадиспецифичный эмбриональный антиген 4; TNNC1 – тропонин C, тип 1; TNNT3 – кардиальный тропонин I, тип 3; TNNT2 – кардиальный тропонин T, тип 2; TPM1 – тропомиозин 1; TRA-1-60 – эпителио подокаликсина; TTR – транстретин; WNT – Wingless/Integrated; Y-27632 – ингибитор протеинкиназы ROCK.

* Адресат для корреспонденции.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — заболевание, которое характеризуется утолщением стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки, прогрессирующей сердечной недостаточностью, аритмиями и высоким риском внезапной сердечной смерти. Данное заболевание является одной из наиболее распространенных сердечно-сосудистых патологий (1 случай на 500 человек) [1]. Частота ежегодной смертности из-за ГКМП составляет 1–5% [2]. Около 50% случаев ГКМП обусловлено мутациями в генах, кодирующих главным образом саркомерные белки [3, 4]. На сегодняшний день не существует способов остановить прогрессирование ГКМП, поскольку существующая медикаментозная терапия является симптоматической. Проблема заключается в отсутствии адекватных модельных систем, которые позволяли бы изучать патологические процессы, имеющие место при ГКМП, и подбирать для терапии лекарства, которые воздействуют на причины развития заболевания, а не на его последствия.

Исследование взаимосвязи между мутациями в саркомерных белках и развитием патологического фенотипа ограничено трудностями получения образцов сердечной ткани пациентов с ГКМП и невозможностью долгосрочного поддержания и размножения кардиомиоцитов в культуре. В связи с этим много работ по изучению ГКМП было проведено на моделях трансгенных животных [5–7]. Однако различия в экспрессии саркомерных белков, частоте сокращений, электрофизиологии и регуляции потоков ионов кальция между кардиомиоцитами человека и других животных значительно снижают эффективность использования таких моделей [8, 9]. Решение проблемы моделирования ГКМП становится возможным благодаря технологии репрограммирования соматических клеток человека к плюрипотентному состоянию с помощью индукции сверхэкспрессии определенного набора генов и получению так называемых индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [10, 11]. В дальнейшем ИПСК могут быть дифференцированы в любой тип клеток организма, включая кардиомиоциты, которые можно использовать в качестве моделей наследственных сердечно-сосудистых заболеваний. Данный подход открывает новые возможности для исследования патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний на клеточном и молекулярном уровнях, поиска лекарственных препаратов и других методов терапии.

Благодаря использованию ИПСК и их последующей направленной дифференцировке удалось получить кардиомиоциты пациентов с вызывающими ГКМП мутациями в генах сарко-

мерных белков. Такие кардиомиоциты демонстрируют основные признаки ГКМП на клеточном уровне: увеличенный размер, дезорганизацию саркомеров и миофибрилл, нарушенную динамику потоков ионов кальция и более высокую частоту аритмических событий [12–14]. Однако то, каким образом мутации в саркомерных белках приводят к гипертрофии кардиомиоцитов и нарушению динамики потоков ионов кальция, еще только предстоит выяснить.

Целью данной работы являлось создание клеточной модели для изучения молекулярных механизмов ГКМП. Технология ИПСК была использована для получения кардиомиоцитов пациента с ГКМП, а способность кардиомиоцитов воспроизводить характерные особенности данного заболевания была проверена на примере такого раннего признака ГКМП, как нарушенная динамика потоков ионов кальция.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск мутаций в генах, ассоциированных с наследственной ГКМП. Геномную ДНК выделяли из мононуклеарных клеток крови пациента с диагнозом ГКМП с помощью Quick-DNA Mini-prep Kit («Zymo Research», США). В компании «Генотек» (Россия) на платформе HiSeq 2500 («Illumina», США) было проведено массовое параллельное секвенирование клинического экзоста (5300 генов) пациента. Полученные нуклеотидные последовательности были выравнены на геном человека (версия hg_38). На наличие несинонимичных нуклеотидных замен были проверены следующие гены, ассоциированные с наследственной ГКМП: *ACTC1*, *CAV3*, *GLA*, *LAMP2*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *PRKAG2*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1* и *TTR*. Выявленная в 12-м экзоне гена *MYBPC3* мутация R326Q была подтверждена с помощью секвенирования по Сэнгеру, которое выполняли на секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser («Applied Biosystems», США) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Получение пациент-специфичных ИПСК. Мононуклеарные клетки выделяли из крови пациента с ГКМП посредством центрифугирования в градиенте фикола (1,077 г/мл) и культивировали на покрытых 0,1%-ным желатином поверхностях в среде StemPro34 («Thermo Fisher Scientific», США), содержавшей StemPro34 Supplement («Thermo Fisher Scientific», США), 1× пенициллин-стрептомицин («Lonza», Швейцария), 100 нг/мл фактора стволовых клеток («Peprotech», США), 50 нг/мл интерлейкина 3 («Peprotech», США), 25 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора («Peprotech»,

США), 2 ед/мл эритропоэтина («Биннофарм», Россия), 40 нг/мл инсулиноподобного фактора роста 1 («Reprotech», США) и 1 мкг/мл дексаметазона («Дальхимфарм», Россия). Мононуклеарные клетки (2–3 млн) были нуклеофицированы смесью эписомных векторов, экспрессирующих гены *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC* и *LIN28* («Addgene», США; IDs #41855-41858, #41813-41814), по 0,6 мкг каждого вектора. Нуклеофекцию проводили с использованием Amaxa™ Human CD34 Cell Nucleofector™ Kit («Lonza», Швейцария) на приборе Lonza Nucleofector 2b («Lonza», Швейцария). После нуклеофекции клетки рассаживали на Geltrex LDEV-Free hESC-Qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix («Thermo Fisher Scientific», США) в среду для культивирования мононуклеарных клеток. Репрограммирование проводили согласно протоколу к Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit («Thermo Fisher Scientific», США). На следующий день после нуклеофекции среду меняли на Advanced DMEM/F12 («Thermo Fisher Scientific», США), содержащую 1× N2 Supplement («Thermo Fisher Scientific», США), 1× B27 Supplement («Thermo Fisher Scientific», США), 1× раствор заменимых аминокислот («Lonza», Швейцария), 1× GlutaMAX Supplement («Thermo Fisher Scientific», США), 0,1 мМ β-меркаптоэтанол («Sigma-Aldrich», США) и 100 нг/мл основного фактора роста фибробластов («Biolegend», США). Начиная с 9-го дня после нуклеофекции, клетки культивировали в среде Essential 8 Medium («Thermo Fisher Scientific», США). Через неделю после перевода клеток на среду Essential 8 Medium формировались колонии, сходные по морфологии с колониями плюрипотентных клеток человека. Колонии переносили с помощью капилляра на слой фидера (митотически инактивированных фибробластов мыши) и культивировали в среде Knockout DMEM («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 15% Knockout Serum Replacement («Thermo Fisher Scientific», США), 1× GlutaMAX Supplement («Thermo Fisher Scientific», США), 1× пенициллин-стрептомицин («Lonza», Швейцария), 1× раствор заменимых аминокислот («Lonza», Швейцария), 0,05 мМ β-меркаптоэтанол («Sigma-Aldrich», США) и 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов («Biolegend», США).

Характеристика линий ИПСК. Анализ экспрессии щелочной фосфатазы и генов, вовлеченных в поддержание плюрипотентного состояния, а также бисульфитное секвенирование промоторной области гена *NANOG* в полученных при репрограммировании клеточных линиях проводили, как описано ранее [15]. Спонтанную дифференцировку клеток осуществляли путем образо-

вания эмбрионидных теллец [15]. 14-Дневные эмбрионидные телльца дезагрегировали 0,25%-ным трипсином. Клеточную суспензию рассаживали в 4-луночные планшеты и культивировали еще семь дней до проведения иммунофлуоресцентного окрашивания.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. ИПСК или их дифференцированные производные фиксировали в течение 10 мин в 4%-ном параформальдегиде, пермеабилizировали в течение 10 мин в 0,4%-ном Triton-X100 или 96%-ном этаноле (для TRA-1-60). Иммунофлуоресцентное окрашивание для SSEA-4 выполняли без стадии пермеабилizации. Клетки инкубировали в течение 30 мин в блокирующем буфере (1%-ный БСА в PBS), 18 ч при 4 °С с первыми антителами и 1 ч при комнатной температуре со вторыми антителами. После каждой инкубации с антителами проводили отмывку в PBS (2 раза по 15 мин). Для общего окрашивания клеток использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). Образцы анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-E («Nikon», Япония).

Первые антитела и рабочие разведения: OCT4 (sc-5279; «Santa Cruz Biotechnology», США; 1 : 200), NANOG (RCAB003P; «ReproCELL», Япония; 1 : 200), SSEA-4 (ab16287; «Abcam», Великобритания; 1 : 50), TRA-1-60 (ab16288; «Abcam», Великобритания; 1 : 200), нейрофиламент 200 (N0142; «Sigma-Aldrich», США; 1 : 500), βIII-тубулин (ab7751; «Abcam», Великобритания; 1 : 100), CD31 (131M; «Cell Marque», США; 1 : 100), гладкомышечный α-актин (M0851; «Dako», США; 1 : 100), кардиальный тропонин T (ab8295; «Abcam», Великобритания; 1 : 100), вентрикулярная форма регуляторной легкой цепи β-миозина (ab79935; «Abcam», Великобритания; 1 : 100).

Вторые антитела («Thermo Fisher Scientific», США; рабочее разведение – 1 : 400): Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H + L) highly cross-adsorbed (A11031), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) highly cross-adsorbed (A11029), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 cross-adsorbed (A21121), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed (A11011), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed (A11008).

Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты. ИПСК культивировали 2–3 пассажа в бесфидерных условиях: на Geltrex LDEV-Free hESC-Qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix в среде Essential 8 Medium («Thermo Fisher Scientific», США). ИПСК в соотношении 1 : 8 рассаживали в 12-луночный планшет. Через 3–4 дня по достижении конfluence-ности клеток 80–90% проводили дифференци-

ровку в соответствии с протоколом Burridge et al. [16], начиная с добавления к клеткам на 48 ч среды RPMI 1640 («Lonza», Швейцария), содержащей 1× B27 Supplement без инсулина («Thermo Fisher Scientific», США) и 6–8 мкМ CHIR99021 («Sigma-Aldrich», США). Для запуска дифференцировки линии ИПСК HCM11f3 использовали 6 мкМ CHIR99021, а для линии ИПСК m34Sk3 – 8 мкМ CHIR99021. Через 72 ч после начала дифференцировки на 48 ч добавляли среду RPMI 1640, содержащую 1× B27 Supplement без инсулина и 5 мкМ IWP2 («Sigma-Aldrich», США). Начиная с 7-го дня дифференцировки, клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 1× B27 Supplement («Thermo Fisher Scientific», США).

На 20-й день дифференцировки клетки рассаживали с помощью TrypLE™ Express («Thermo Fisher Scientific», США) на покрытые 0,1%-ным желатином поверхности в среду RPMI 1640 («Lonza», Швейцария), содержащую 20% эмбриональной бычьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific», США) и 10 мкМ Y-27632 («StemRD», США). Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов, начиная со следующего дня после пересадки, клетки в течение 7–10 дней подвергали метаболической селекции и культивировали в среде RPMI 1640 без D-глюкозы («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 213 мкг/мл L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate («Sigma-Aldrich», США), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *Oryza sativa* («Sigma-Aldrich», США), и 5 мМ DL-лактат натрия (L4263, «Sigma-Aldrich», США) [16]. Метаболическая селекция основана на способности кардиомиоцитов, в отличие от других типов клеток, метаболизировать лактат в отсутствие глюкозы и выживать в данной среде.

Проточная цитофлуориметрия. На 20-й день направленной дифференцировки популяцию дифференцированных производных ИПСК дезагрегировали с помощью TrypLE™ Express до одноклеточного состояния. Число жизнеспособных клеток подсчитывали на Countess™ Automated Cell Counter («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием окрашивания трипановым синим. Фиксацию, пермеабиллизацию клеток, инкубирование с антителами и отмывку от несвязавшихся антител проводили согласно протоколу Lian et al. [17]. Первые антитела – кардиальный тропонин T (ab8295, 8 мкг на 500 тыс. клеток; «Abcam», Великобритания). Вторые антитела – Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) highly cross adsorbed (A11029, 2 мкг на 500 тыс. клеток; «Thermo Fisher Scientific», США). Подсчет доли позитивных по кардиальному тропонину T клеток выполняли на BD FACS Canto II («BD

Biosciences», США). В качестве изотипического контроля использовали клетки, инкубировавшиеся только со вторыми антителами.

Исследование динамики потоков ионов кальция. Динамику потоков ионов кальция в кардиомиоцитах исследовали с помощью кальций-зависимого флуоресцентного красителя fluo-4, AM («Thermo Fisher Scientific», США) [18]. К клеткам добавляли нагретую до 37 °C среду RPMI 1640/B27 Supplement, содержащую 4 мкг/мл fluo-4. Инкубацию с красителем проводили в течение 30 мин при 37 °C в CO₂-инкубаторе («Binder», Германия). Далее среду с fluo-4 заменяли на нагретый до 37 °C раствор Tyrode (140 мМ NaCl, 4,5 мМ KCl, 10 мМ глюкоза, 10 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂, 1,8 мМ CaCl₂, 1%-ный пенициллин/стрептомицин, pH 7,4).

Запись видеоизображений динамики кальций-зависимой флуоресценции проводили в течение 30 с при экспозиции 400 и 100 мс с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-E («Nikon», Япония) и программного обеспечения к нему. Видеоизображения обрабатывали с использованием программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Статистическую значимость различий параметров между кардиомиоцитами пациента с ГКМП и здорового донора оценивали с помощью ANOVA-теста с использованием F-критерия отсутствия соответствия и последующим наименее значимым различием Фишера для межгруппового сравнения. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетический анализ пациента с ГКМП. 41-Летний пациент с ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка проходил лечение в НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России. Для клинической картины пациента также были характерны умеренная митральная недостаточность, артериальная гипертония 2-й степени, хроническая сердечная недостаточность 1-й степени с функциональным классом II (по NYHA), а также синкопе. Массовое параллельное секвенирование клинического экзона (5300 генов) пациента и анализ результатов секвенирования для 14 генов, ассоциированных с наследственной ГКМП, выявили миссенс-мутацию – замену аргинина на глутамин (R326Q) в 12-м экзоне одного из аллелей гена *MYBPC3*, кодирующего саркомерный белок – миозин-связывающий белок С. Секвенирование 12-го экзона гена *MYBPC3* по Сэнгеру подтвердило наличие данной мутации у пациента (рис. 1, а).

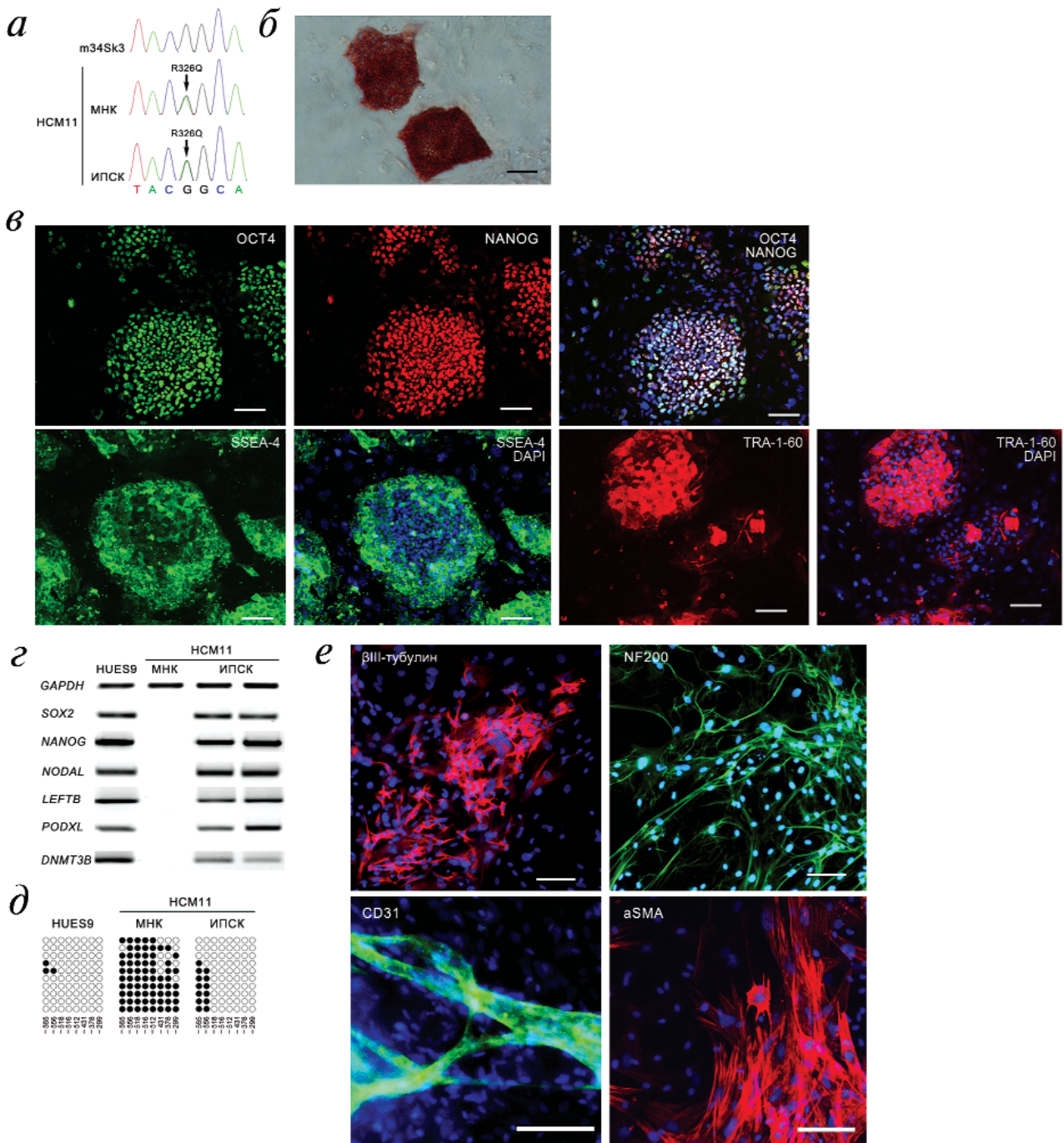


Рис. 1. Характеристика ИПСК, полученных в результате репрограммирования к плюрипотентному состоянию мононуклеарных клеток пациента с ГКМП. HCM11 – пациент с ГКМП, MНК – мононуклеарные клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. *а* – Наличие мутации R326Q в 12-м экзоне гена *MYBPC3* в мононуклеарных клетках и ИПСК пациента с ГКМП, m34Sk3 – здоровый контроль; *б* – экспрессия щелочной фосфатазы в полученных при репрограммировании линиях клеток. Масштабный отрезок – 100 мкм; *в* – экспрессия транскрипционных факторов OCT4 и NANOG, а также поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1-60 в полученных при репрограммировании линиях клеток. Ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок – 100 мкм; *г* – анализ транскрипции генов, экспрессирующихся в плюрипотентных клетках человека, в линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9, мононуклеарных клетках пациента с ГКМП и полученных при репрограммировании линиях клеток; *д* – профиль метилирования CpG-динуклеотидов промоторной области гена *NANOG*. Черными и белыми кружками показаны метилированные и неметилированные CpG-динуклеотиды соответственно. Числами обозначены позиции CpG-динуклеотидов в промоторной области гена *NANOG*; *е* – спектр спонтанной дифференцировки полученных при репрограммировании линий клеток. Экспрессия маркеров эктодермы (βIII-тубулин, NF200) и мезодермы (CD31, αSMA) в дифференцированных производных. Ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок – 100 мкм

Получение пациент-специфичных ИПСК. На следующем этапе моноклеарные клетки крови пациента с мутацией R326Q в гене *MYBPC3* были нуклеофицированы эписомными векторами, экспрессирующими гены *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC* и *LIN28* [19]. Колонии, сходные по морфологии с колониями плюрипотентных клеток человека, появлялись, начиная с 15-го дня после нуклеофекции. Колонии культивировали на слое фидера в среде для плюрипотентных клеток человека до образования стабильных клеточных линий. В результате репрограммирования моноклеарных клеток пациента с ГКМП к плюрипотентному состоянию были получены четыре линии клеток, которые были в дальнейшем охарактеризованы.

Полученные клеточные линии экспрессировали такие маркеры плюрипотентного состояния, как щелочная фосфатаза (рис. 1, б), транскрипционные факторы *OCT4* и *NANOG*, поверхностные антигены SSEA-4 и TRA-1-60 (рис. 1, в). Помимо экспрессии генов *OCT4* и *NANOG*, в полученных клеточных линиях была обнаружена экспрессия ряда других генов, вовлеченных в поддержание плюрипотентного состояния (*SOX2*, *NODAL*, *LEFTB*, *PODXL*, *DNMT3B*) (рис. 1, г). Аналогичный профиль экспрессии этих генов наблюдался в линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9, взятой в качестве положительного контроля плюрипотентного состояния, в то время как в исходных моноклеарных клетках эти гены не экспрессировались. Более того, промоторная область гена *NANOG* в полученных клеточных линиях была деметилирована, как и в линии HUES9, в то время как промоторная область гена *NANOG* в моноклеарных клетках — метилирована (рис. 1, д). Анализ спектра дифференцированных производных, полученных при спонтанной дифференцировке клеточных линий, выявил экспрессию маркеров двух зародышевых листков: эктодермы и мезодермы (рис. 1, е). Таким образом, полученные линии клеток соответствовали критериям ИПСК: имели характерную для плюрипотентных клеток морфологию, экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния и были способны дифференцироваться в производные различных зародышевых листков. Секвенирование 12-го экзона гена *MYBPC3* в пациент-специфичных ИПСК подтвердило наличие мутации R326Q (рис. 1, а).

Направленная дифференцировка пациент-специфичных ИПСК в кардиомиоциты. Линия пациент-специфичных ИПСК с мутацией R326Q в гене *MYBPC3* (НСМ11f3) была дифференцирована в кардиомиоциты (рис. 2, а). В качестве контроля использовали линию ИПСК здоро-

го донора (m34Sk3), полученную и охарактеризованную ранее [20]. При направленной дифференцировке ИПСК обоих типов первые зоны спонтанных сокращений появлялись на 8–9-й дни дифференцировки. На 20-й день дифференцировки в популяции дифференцированных клеток оценивали долю клеток, экспрессирующих кардиальный тропонин Т, являющийся маркером кардиомиоцитов. Эффективность направленной дифференцировки в кардиомиоциты для пациент-специфичных ИПСК составила 42,3%, а для контрольной линии — 47% (рис. 2, б). Далее дифференцированные клетки были подвергнуты метаболической селекции для выделения чистой популяции кардиомиоцитов. На 45-й день дифференцировки практически все клетки, прошедшие метаболическую селекцию, экспрессировали кардиальный тропонин Т (рис. 2, в). Наряду с кардиальным тропонином Т, в пациент-специфичных и контрольных кардиомиоцитах была исследована экспрессия вентрикулярной формы регуляторной легкой цепи β-миозина (MLC2) — саркомерного белка, экспрессия которого специфична для вентрикулярных кардиомиоцитов. Данный белок экспрессировался более чем в 90% клеток, позитивных по кардиальному тропонину Т. Следовательно, кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки пациент-специфичных и контрольных ИПСК, были преимущественно вентрикулярными.

Нарушенная динамика потоков ионов кальция в пациент-специфичных кардиомиоцитах. Динамика потоков ионов кальция в кардиомиоцитах, полученных при направленной дифференцировке пациент-специфичных и контрольных ИПСК, была исследована с использованием флуоресцентного красителя fluo-4, интенсивность флуоресценции которого зависит от концентрации ионов кальция в клетке. На 74-й день дифференцировки для пациент-специфичных и контрольных кардиомиоцитов были записаны видеоизображения флуоресценции fluo-4, отражающие динамику потоков ионов кальция. В результате обработки видеоизображений были построены графики динамики потоков ионов кальция в пациент-специфичных и контрольных кардиомиоцитах (рис. 2, г). Контрольные кардиомиоциты демонстрировали регулярное чередование процессов выброса ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и их обратного захвата (рис. 2, г), в то время как пациент-специфичные кардиомиоциты показывали нерегулярное чередование выбросов ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и их обратного захвата (рис. 2, г), более продолжительное время между выбросами ионов кальция

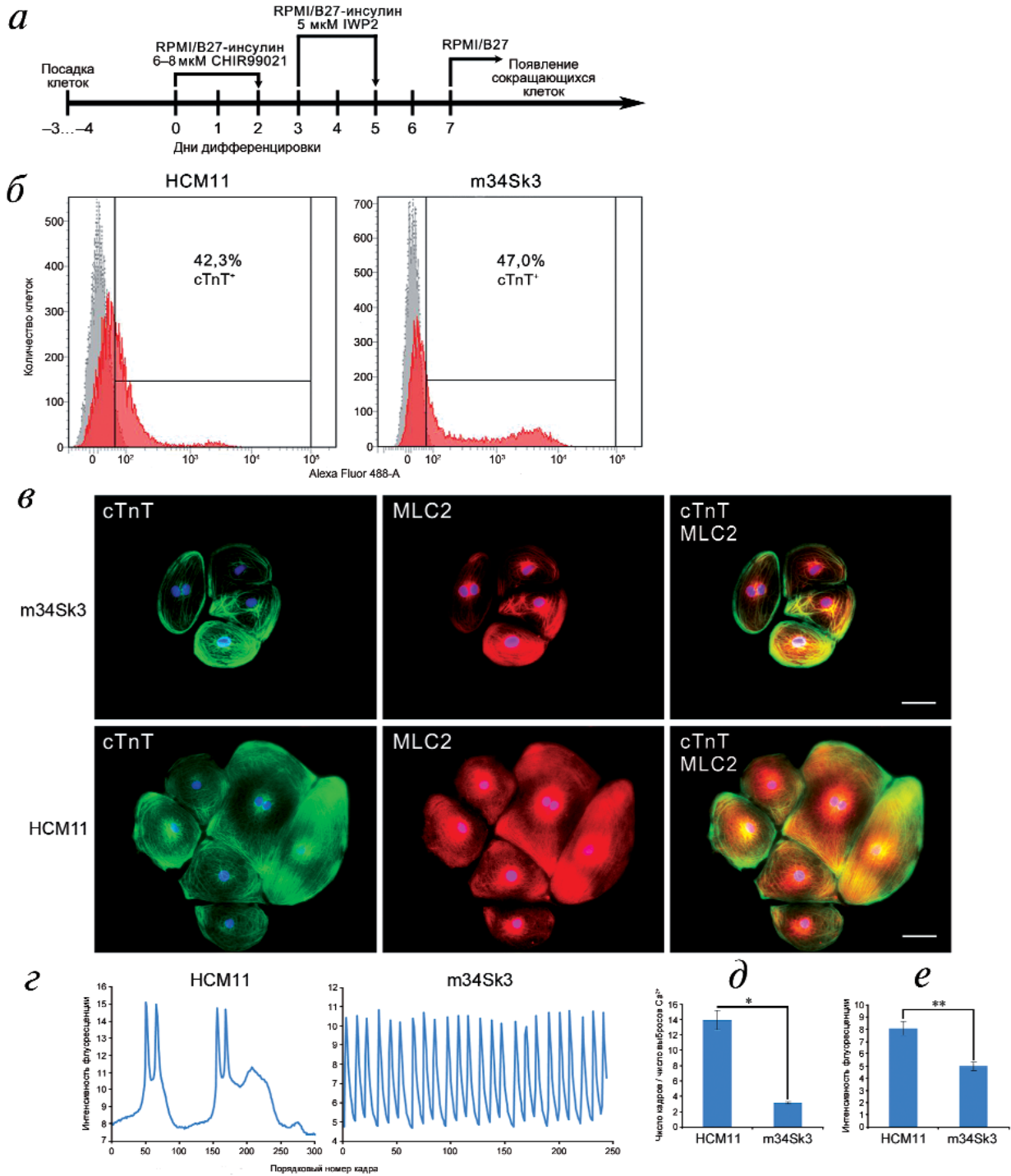


Рис. 2. Получение и характеристика кардиомиоцитов пациента с ГКМП (HCM11) и здорового донора (m34Sk3). *а* – Схема протокола, использованного для направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты; *б* – эффективность направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты. cTnT – кардиальный тропонин Т. Серым цветом показан изотипический контроль; *в* – экспрессия кардиального тропонина Т (cTnT) и вентрикулярной формы регуляторной легкой цепи β-миозина (MLC2) в кардиомиоцитах, полученных в результате направленной дифференцировки ИПСК, на 45-й день дифференцировки. Ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок – 50 мкм; *г* – нарушение регулярности выбросов ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и их обратного захвата в кардиомиоцитах, полученных при дифференцировке ИПСК пациента с ГКМП, в сравнении с контрольными кардиомиоцитами; *д* – увеличение времени между выбросами ионов кальция в кардиомиоцитах, полученных при дифференцировке ИПСК пациента с ГКМП, в сравнении с контрольными кардиомиоцитами; * $p < 0,01$; *е* – повышенная внутриклеточная концентрация ионов кальция в состоянии покоя в кардиомиоцитах, полученных при дифференцировке ИПСК пациента с ГКМП, в сравнении с контрольными кардиомиоцитами; ** $p < 0,05$

из саркоплазматического ретикулума (рис. 2, д) и повышенную внутриклеточную концентрацию ионов кальция на стадии покоя (рис. 2, е). Таким образом, кардиомиоциты, полученные от пациента с мутацией R326Q в гене *MYBPC3* с помощью технологии ИПСК, демонстрировали такие ранние признаки ГКМП, как нарушенная динамика потоков ионов кальция и их повышенная внутриклеточная концентрация.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате генетического анализа у пациента с ГКМП была выявлена мутация R326Q в гене *MYBPC3*. *MYBPC3*, наряду с *MYH7*, является геном, в котором наиболее часто встречаются мутации, вызывающие наследственную ГКМП. Их частота составляет ~40% [21]. Однако, согласно результатам популяционно-генетических исследований, мутация R326Q в гене *MYBPC3* имеет статус «benign» (база данных ClinVar, NCBI), т.е. считается нейтральной и не приводит к развитию ГКМП. В связи с этим было интересно проверить, обладают ли кардиомиоциты с данной мутацией какими-либо особенностями, связанными с ГКМП.

Кардиомиоциты с мутацией R326Q в гене *MYBPC3* были получены путем направленной дифференцировки пациент-специфичных ИПСК с помощью протокола, основанного на активации сигнального пути WNT/ β -катенин посредством ингибирования протеинкиназы GSK3 β (с помощью CHIR99021) и последующем ингибировании WNT (с помощью IWP2) и использовании среды RPMI 1640 с добавлением B27 Supplement [16]. Аналогичным образом была осуществлена дифференцировка ИПСК здорового донора. Эффективность дифференцировки в исходном протоколе составила в среднем 81%, в то время как эффективность дифференцировки ИПСК пациента с ГКМП и здорового донора варьировала в диапазоне 40–50% (рис. 2, б). Более низкая эффективность направленной дифференцировки в кардиомиоциты в нашем исследовании может объясняться различиями в методах получения и культивирования линий ИПСК. Так, Burrig et al. для доставки факторов репрограммирования использовали вирус Сендай (для фибробластов и мононуклеарных клеток) и плазмидные векторы (для фибробластов). После получения линии ИПСК культивировали в бесфидерных условиях – на покрытии Synthmax II-SC («Corning», США) в среде Essential 8 Medium. В нашем исследовании были использованы ИПСК, полученные с помощью эписомных векторов. После получения ИПСК культивиро-

вали на слое фидера и переводили в бесфидерные условия культивирования (Geltrex и среда Essential 8 Medium) лишь за 2–3 пассажа до начала направленной дифференцировки в кардиомиоциты. Тем не менее даже 40–50%-ная эффективность дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты, особенно в сочетании с метаболической селекцией, может оказаться вполне достаточной для успешного моделирования и исследования механизмов наследственных сердечно-сосудистых заболеваний.

Известно, что кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки плюрипотентных клеток, имеют незрелый фенотип – неупорядоченную организацию миофибрилл, экспрессируют атриальную форму регуляторной легкой цепи β -миозина, имеют промежуточную атриально-подобную форму потенциала действия. В процессе культивирования кардиомиоцитов происходит их созревание. Примерно на 30-й день дифференцировки начинается их специализация по типам (вентрикулярные, атриальные, нодальные), причем большинство кардиомиоцитов становится вентрикулярными [16]. Оценка коэкспрессии кардиального тропонина T (раннего маркера кардиальной дифференцировки) и MLC2 (саркомерного белка вентрикулярных кардиомиоцитов) в пациент-специфичных и контрольных кардиомиоцитах на 45-й день дифференцировки показала, что более 90% кардиомиоцитов являются вентрикулярными (рис. 2, в). Этот факт согласуется с результатами других протоколов направленной дифференцировки плюрипотентных клеток в кардиомиоциты [16].

Одним из ранних признаков ГКМП, который предшествует гипертрофическому ремоделированию кардиомиоцитов, является нарушенная динамика внутриклеточных потоков ионов кальция, приводящая к повышенному содержанию ионов кальция в цитоплазме в период покоя кардиомиоцита. Показано, что повышенная внутриклеточная концентрация ионов кальция вызывает активацию фосфатазы кальциневрин, которая дефосфорилирует и активирует транскрипционный фактор NFAT, что приводит к изменению паттерна экспрессии генов и развитию гипертрофии кардиомиоцитов. Кроме того, повышенная концентрация ионов кальция предрасполагает к аритмическим событиям в кардиомиоцитах [12, 22]. По сравнению с контрольными кардиомиоцитами, пациент-специфичные кардиомиоциты имели целый ряд нарушений в динамике потоков ионов кальция: нерегулярность выбросов ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и их обратного захвата, большее время между выбросами ионов

кальция, свидетельствующее о более продолжительном обратном захвате ионов кальция саркоплазматическим ретикуломом, и повышенную внутриклеточную концентрацию ионов кальция в состоянии покоя (рис. 2, *z–e*). Похожая динамика потоков ионов кальция была показана в кардиомиоцитах, полученных в результате направленной дифференцировки пациент-специфичных ИПСК и несущих мутации R663N и R442G в гене *MYH7*, вызывающие наследственную ГКМП [12, 13]. Более того, повышенная внутриклеточная концентрация ионов кальция в пациент-специфичных кардиомиоцитах согласуется с эпизодами синкопе у пациента с ГКМП, которые указывают на наличие аритмических событий в клинической картине. Тот факт, что кардиомиоциты, полученные при направленной дифференцировке пациент-специфичных ИПСК, демонстрируют нарушения в динамике потоков ионов кальция, предполагает, что наряду с мутацией R326Q в гене *MYBPC3* у пациента могут быть еще мутации и/или SNPs, которые и приводят к подобным эффектам. Поскольку результаты секвенирования клинического экзема оценивались только для 14 ассоциированных с ГКМП генов, список анализируемых генов следует расширить, включив в него гены, которые могут быть ассоциированы с ГКМП в более редких случаях или задействованы в работе саркоплазматического ретикула. Следовательно, более детальный генетический

анализ пациента должен стать предметом для дальнейших исследований.

Таким образом, с использованием технологии ИПСК получены кардиомиоциты пациента с ГКМП, способные воспроизводить такие признаки данного заболевания, как нарушенная динамика потоков ионов кальция и их повышенная внутриклеточная концентрация, что делает данные клетки перспективной моделью для изучения патогенеза ГКМП.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-75-10039).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От включенного в исследование пациента было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maron, B.J. (2002) Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review, *JAMA*, **287**, 1308–1320, doi: 10.1001/jama.287.10.1308.
2. Maron, B.J., Maron, M.S., and Semsarian, C. (2012) Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **60**, 705–715, doi: 10.1016/j.jacc.2012.02.068.
3. Houston, B.A., and Stevens, G.R. (2014) Hypertrophic cardiomyopathy: a review, *Clin. Med. Insights Cardiol.*, **8**, 53–65, doi: 10.4137/CMC.S15717.
4. Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M.S., and Maron, B.J. (2015) New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **65**, 1249–1254, doi: 10.1016/j.jacc.2015.01.019.
5. Yang, Q., Sanbe, A., Osinska, H., Hewett, T.E., Klevitsky, R., and Robbins, J. (1998) A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.*, **102**, 1292–1300, doi: 10.1172/JCI13880.
6. Marian, A.J., Wu, Y., Lim, D.S., McCluggage, M., Youker, K., Yu, Q.T., Brugada, R., DeMayo, F., Quinones, M., and Roberts, R. (1999) A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy, *J. Clin. Invest.*, **104**, 1683–1692, doi: 10.1172/JCI17956.
7. Semsarian, C., Ahmad, I., Giewat, M., Georgakopoulos, D., Schmitt, J.P., McConnell, B.K., Reiken, S., Mende, U., Marks, A.R., Kass, D.A., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2002) The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1013–1020, doi: 10.1172/JCI14677.
8. Salama, G., and London, B. (2007) Mouse models of long QT syndrome, *J. Physiol.*, **578**, 43–53, doi: 10.1113/jphysiol.2006.118745.
9. Ross, S.B., Fraser, S.T., and Semsarian, C. (2016) Induced pluripotent stem cells in the inherited cardiomyopathies: from disease mechanisms to novel therapies, *Trends Cardiovasc. Med.*, **26**, 663–672, doi: 10.1016/j.tcm.2016.05.001.
10. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
11. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917–1920, doi: 10.1126/science.1151526.
12. Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., Abilez, O.J., Hu, S., Ebert, A.D., Navarrete, E.G., Simmons, C.S., Wheeler, M., Pruitt, B., Lewis, R., Yamaguchi, Y., Ashley, E.A., Bers, D.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., and Wu, J.C.

- (2013) Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **12**, 101–113, doi: 10.1016/j.stem.2012.10.010.
13. Han, L., Li, Y., Tcho, J., Kaplan, A.D., Lin, B., Mich-Basso, J., Lis, A., Hassan, N., London, B., Bett, G.C., Tobita, K., Rasmusson, R.L., and Yang, L. (2014) Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells, *Cardiovasc. Res.*, **104**, 258–269, doi: 10.1093/cvr/cvu205.
 14. Tanaka, A., Yuasa, S., Mearini, G., Egashira, T., Seki, T., Kodaira, M., Kusumoto, D., Kuroda, Y., Okata, S., Suzuki, T., Inohara, T., Arimura, T., Makino, S., Kimura, K., Kimura, A., Furukawa, T., Carrier, L., Node, K., and Fukuda, K. (2014) Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J. Am. Heart Assoc.*, **3**, e001263, doi: 10.1161/JAHA.114.001263
 15. Medvedev, S.P., Grigor'eva, E.V., Shevchenko, A.I., Malakhova, A.A., Dementyeva, E.V., Shilov, A.A., Pokushalov, E.A., Zaidman, A.M., Aleksandrova, M.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., and Zakian, S.M. (2011) Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage, *Stem Cells Dev.*, **20**, 1099–1112, doi: 10.1089/scd.2010.0249.
 16. Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Pews, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., and Wu, J.C. (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes, *Nat. Methods*, **11**, 855–860, doi: 10.1038/nmeth.2999.
 17. Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., and Palecek, S.P. (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions, *Nat. Protoc.*, **8**, 162–175, doi: 10.1038/nprot.2012.150.
 18. Слотвицкий М.М., Цветлая В.А., Фролова Ш.Р., Деметтьева Е.В., Агладзе К.И. (2018) Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **22**, 187–195, doi: 10.18699/VJ18.346.
 19. Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013) An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells, *Stem Cells*, **31**, 458–466, doi: 10.1002/stem.1293.
 20. Валетдинова К.Р. (2016) *Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека*. Дис. канд. биол. наук, ИГиГ, Новосибирск.
 21. Pasipoularides, A. (2018) Challenges and controversies in hypertrophic cardiomyopathy: clinical, genomic and basic science perspectives, *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.)*, **71**, 132–138, doi: 10.1016/j.rec.2017.07.003.
 22. Konno, T., Chang, S., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2010) Genetics of hypertrophic cardiomyopathy, *Curr. Opin. Cardiol.*, **25**, 205–209, doi: 10.1097/HCO.0b013e3283375698.

APPLYING PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS TO CREATE A MODEL OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

E. V. Dementyeva^{1,2,3*}, S. P. Medvedev^{1,2,3,4}, V. R. Kovalenko^{1,2,3,4}, Yu. V. Vyatkin^{4,5}, E. I. Kretov², M. M. Slotvitsky⁶, D. N. Shtokalo⁵, E. A. Pokushalov², and S. M. Zakian^{1,2,3,4}

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

² Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, 630055 Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

⁵ Novel Software Systems Ltd., 630090 Novosibirsk, Russia

⁶ Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Received October 7, 2018

Revised November 25, 2018

Accepted November 25, 2018

Generating patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their subsequent differentiation into cardiomyocytes afford new opportunities to study pathogenesis of inherited cardiovascular diseases. One of such diseases is hypertrophic cardiomyopathy, for which effective therapy methods have not been developed so far. In this study, an approach based on patient-specific iPSCs was applied to create a model of the disease. Genetic analysis revealed the R326Q mutation in *MYBPC3* gene of patient with hypertrophic cardiomyopathy. iPSCs of the patient were generated and characterized. iPSCs of the patient and a healthy donor were differentiated into cardiomyocytes. The patient-specific cardiomyocytes reproduced such traits of hypertrophic cardiomyopathy as the abnormal calcium handling and increased intracellular calcium. Thus, cardiomyocytes obtained by directed differentiation of iPSCs of the hypertrophic cardiomyopathy patient may be used as a model system to study pathogenesis of the disease.

Keywords: induced pluripotent stem cells, human disease models, hypertrophic cardiomyopathy, cardiomyocytes