

Влияние ингибитора PARP1 на экспрессию генов, ассоциированных с болезнью Хантингтона, в дифференцированных производных ИПСК

Макеева В.С.^{1*}, Дырхеева Н.С.², Закиян С.М.¹, Малахова А.А.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* vladamakkeeva@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Хантингтона; фермент PARP; срединные шипиковые нейроны; ИПСК; ингибиторы

Мотивация и цель: Болезнь Хантингтона (БХ) – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией CAG кодонов в первом экзоне гена *HTT* и приводящее к поражению функций и гибели срединных шипиковых нейронов (СШН) полосатого тела мозга пациентов. Для поиска средства терапии широко применяются клеточные модели на основе клеток пациента, благодаря которым имеется возможность разработать пациент-специфичное лекарство, а также изучить особенности влияния генетического фона на патогенез. PARP-ингибиторы, изначально созданные для борьбы с онкозаболеваниями, связанными с мутациями в гене *BRCA1/2*, в последнее время тестируются для терапии нейродегенерации, в частности болезнью Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона.

Вследствие развития патогенных процессов в срединных шипиковых нейронах под влиянием мутантной формы хантингтина и хронического нарушения целостности ДНК происходит гиперактивация PARP, детектирующего одноцепочечные разрывы ДНК и привлекающего участников машины репарации путем синтеза меток поли-(АДФ)-рибозы. Повышенная активность приводит к истощению пула НАД⁺ в клетке, а следовательно, к нарушению энергетического метаболизма клетки и функционирования других НАД-зависимых ферментов. Кроме того, происходит повышение поли-(АДФ)-рибозо-управляемых ферментов, в частности фактора YY1 – который отвечает за экспрессию генов, связанных с развитием стресса ЭПР. Применение ингибиторов должно снизить токсичные для нейронов последствия: так, показано на мышинных моделях болезни Хантингтона R6/2, PARP-ингибиторы способствуют снижению темпов развития симптомов болезни.

Методы и алгоритмы: Получение ИПСК из мононуклеарных клеток периферической крови человека путем репрограммирования с применением временной экспрессии факторов Яманаки. Отбор и характеристика ИПСК с использованием количественной ПЦР для оценки экспрессии факторов плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*), спонтанной дифференцировки и иммунофлуоресцентного анализа на маркеры трех зародышевых листков. Встройка в AAVS1 локус с помощью CRISPR/Cas9 технологии генетических конструкций для экспрессии сенсора стресса ЭПР XBP1-TagRFP. Поиск, на основе анализа литературных данных, генов раннего и позднего начала БХ, изменение

экспрессии которых установлено на клеточных или мышинных моделях БХ, постмортальных образцах пациентов с БХ. Выделение РНК и синтез кДНК. Анализ уровня экспрессии генов-маркеров СШН, стресса ЭПР, болезни Хантингтона.

Результаты: Мы создали клеточную модель на основе ИПСК пациента с 46 CAG повторами в гене НТТ путем их дифференцировки в срединные шипиковые нейроны. Многие факты о механизмах болезни установлены с использованием постмортальных образцов мозга пациентов, мышинных моделей и относятся по большей части к постсимптоматической стадии патогенеза. Для изучения ранних стадий болезни клеточные модели являются более подходящим объектом. Однако необходимо учесть, что популяция получаемых нейронов гетерогенна, и включает кроме СШН и другие типы нейронов и глиальных клеток. И потому результаты экспериментов требуется верификация – поэтому проанализировали экспрессию специфичных генов-маркеров СШН (*CTIP2, ARPP21, GABA, DRD1, DRD2*). Кроме того, для контроля мы выбрали гены с дифференциальной экспрессией как на ранних, так и на поздних этапах болезни Хантингтона и проанализировали отклонения их экспрессии на нашей модели.

Для оценки влияния PARP-ингибиторов на развитие патогенеза мы встроили в геном трансгенную конструкцию, экспрессирующую сенсор XBP1-TagRFP, который при развитии стресса ЭПР светит в красном спектре. Кроме того, мы провели анализ изменения экспрессии генов-маркеров стресса ЭПР – *XBP1, ATF4, GRP78, CHOP* – и генов, изменение экспрессии которых показано как на клеточных и мышинных моделях болезни Хантингтона, так и на постмортальных образцах мозга пациентов.

Выводы: В результате мы получили из шести линий ИПСК пациента с БХ культуры нейронов с разной представленностью СШН, которую оценили при помощи количественной ПЦР и иммунофлуоресцентного окрашивания на специфичные маркеры. Оказалось, что не во всех линиях СШН происходит увеличение экспрессии маркеров стресса ЭПР, что также было видно по поведению сенсора XBP1-TagRFP, и также нет полного совпадения с литературными данными об изменении экспрессии генов, ассоциированных с болезнью Хантингтона.

Тем не менее для линий СШН с повышенным уровнем экспрессии маркеров стресса ЭПР мы смогли показать его снижение после добавления ингибитора PARP Niraparib.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

Effect of PARP1 inhibitor on expression of genes associated with Huntington's disease in differentiated iPSC derivatives

Makeeva V. ^{1*}, Dyrkheeva N. ², Zakian S. ¹, Malakhova A. ¹

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

**vladamakkeeva@gmail.com*

Key words: Huntington's disease; PARP enzyme; medium spiny neurons; iPSCs; inhibitors

Motivation and objective: Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by the expansion of CAG codons in the first exon of the HTT gene, leading to dysfunction and death of medium spiny neurons (MSN) in the striatum of patients' brains. Cell models based on patient cells are widely used to search for a therapeutic agent, which makes it possible to develop a patient-specific drug and to study the influence of genetic background on pathogenesis.

PARP inhibitors, originally created to combat cancers associated with mutations in the BRCA1/2 gene, have recently been tested for the treatment of neurodegeneration, in particular Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. As a result of the development of pathogenic processes in medium spiny neurons under the influence of a mutant form of huntingtin and chronic disruption of DNA integrity, hyperactivation of PARP occurs, which detects single-stranded DNA breaks and attracts participants of the repair machine by synthesizing poly-(ADP)-ribose labels. Increased activity leads to depletion of the NAD⁺ pool in the cell, and, consequently, to disruption of the cell's energy metabolism and the functioning of other NAD-dependent enzymes. In addition, there is an increase in poly-(ADP)-ribose-controlled enzymes, in particular, factor YY1, which is responsible for the expression of genes associated with the development of ER stress. The use of inhibitors should reduce the toxic effects on neurons: thus, it has been shown in mouse models of Huntington's disease R6/2, PARP inhibitors help to reduce the rate of development of disease symptoms. Methods and algorithms: Obtaining iPSCs from human peripheral blood mononuclear cells by reprogramming using transient expression of Yamanaka factors. Selection and characterization of iPSCs using quantitative PCR to assess the expression of pluripotency factors (OCT4, NANOG, SOX2), spontaneous differentiation and immunofluorescence analysis for markers of three germ layers. Insertion into the AAVS1 locus using CRISPR/Cas9 technology of genetic constructs for expression of the ER stress sensor XBP1-TagRFP. Search, based on the analysis of literary data, for genes of early and late onset of HD, the change in expression of which was established in cell or mouse models of HD, postmortem samples of patients with HD. Isolation of RNA and synthesis of cDNA. Analysis of the expression level of genes-markers of SCN, ER stress, Huntington's disease.

Results: We created a cell model based on patient iPSCs with 46 CAG repeats in the HTT gene by differentiating them into medium spiny neurons. Many facts about the mechanisms of the disease have been established using postmortem brain samples of patients, mouse models and relate mostly to the post-symptomatic stage of pathogenesis. For studying the early stages of the disease, cellular models are a more suitable object. However, it is necessary to take into account that the population of the obtained neurons is heterogeneous and includes, in addition to SNH, other types of neurons and glial cells. Therefore, the results of the experiments require verification - therefore, we analyzed the expression of specific marker genes of SNH (CTIP2, ARPP21, GABA, DRD1, DRD2). In addition, for control, we selected genes with differential expression both at the early and late stages of Huntington's disease and analyzed deviations in their expression in our model.

To assess the effect of PARP inhibitors on the development of pathogenesis, we integrated into the genome a transgenic construct expressing the XBP1-TagRFP sensor, which shines in the red spectrum during the development of ER stress. In addition, we

analyzed changes in the expression of ER stress marker genes – XBP1, ATF4, GRP78, CHOP – and genes whose expression changes have been shown both in cell and mouse models of Huntington's disease and in postmortem brain samples from patients.

Conclusions: As a result, we obtained neuronal cultures with different levels of ER stress from six HD patient iPSC lines, which were assessed using quantitative PCR and immunofluorescence staining for specific markers. It turned out that not all ER stress lines show an increase in the expression of ER stress markers, which was also evident from the behavior of the XBP1-TagRFP sensor, and there is also no complete agreement with literature data on changes in the expression of genes associated with HD.

However, for ER stress lines with an increased level of expression of ER stress markers, we were able to show a decrease after the addition of the PARP inhibitor Niraparib.

Funding: The work was supported by the Russian Science Foundation grant (No. 23-15-00224).