Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (ИБР РАН)

УДК 602.6:59; 602.6:612 Рег. № ГЗ 0108-2018-0008 Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690138-8

У ТВЕРЖДАЮ Директор ИБР РАН д-р биол. наук, чл.-корр. РАН А.В. Васильев «10» декабря 2018 г. CONTRACTOR OF THE OF THE

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ (ЛПЛМД ИЛИ FSHD)

по Программе Президиума РАН № 42 «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»

(заключительный отчет)

Руководитель НИР, ведущий научн. сотр., д-р биол. наук

Е.С. Васецкий

подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук,

Исполнители:

биологических наук

10.12. 1. подпись, дата Е.С. Васецкий

Э.Б. Дашинимаев

Б.В. Черняк

Е.А. Киселева 320 RAP

10.12.20

10.12.2018

подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Старший научный сотрудник, кандидат

подпись, дата

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук (зав. лабораторией биоэнергетики клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ)

Старший научный сотрудник, кандидат

биологических наук (НИИ ФХБ имени

А.Н. Белозерского МГУ)

Младший научный сотрудник

подпись, дата

Е.Н. Попова 2018

подпись, дата

О.О. Латыева 12 2018

подпись, дата

Е.Б. Абрамова

Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук

подпись, дата

ΡΕΦΕΡΑΤ

Отчёт 33 с., 2 разд., 9 рис., 1 таб., источников -56., публикаций по теме - 5

ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНАЯ МЫШЕЧНАЯ ДИСТРОФИЯ, МИОБЛАСТЫ, МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, МИГРАЦИЯ КЛЕТОК, ХЕМОКИНЫ, МЕХАНИЗМЫ ФИБРОЗА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ.

Объектом исследования являются иммортализованные миобласты от больных FSHD и здоровых доноров, а также мультипотентные стромальные клетки человека.

Цель настоящей работы - понять механизмы возникновения дефектов миогенеза под действием генов, вовлеченных в FSHD, и использовать полученные знаний для разработки подходов к лечению этого заболевания.

С использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии получены новые оригинальные результаты частично не имеющие аналогов в мировой литературе.

Полученные результаты быть основой для разработки могут новых терапевтических технологий для лечения FSHD. Социальная необходимость разработки новых способов лечения FSHD связана с высокой инвалидизацией экономически активных пациентов. Эффективных способов коррекции и лечения, позволяющих значительно повысить качество жизни И, хотя бы частично, восстановить трудоспособность пациентов, страдающих от FSHD, на сегодня не существует.

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
Раздел 1. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МСК И МИОБЛАСТОВ НА <i>IN VII</i> МОДЕЛИ ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ	rro 8
1.1 Введение	8
1.2 Материалы и методы	10
1.3 Результаты и обсуждение	13
1.4 Заключение	17
Раздел 2. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА <i>DUX4</i> В ГЕНЕРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ В ПАТОГЕНЕЗ FSHD1, А ТАКЖЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЬ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ Е КЛЕТКАХ <i>IN VITRO</i>	E JIX 3 18
2.1 Введение	18
2.2 Материалы и методы	18
2.3 Результаты и обсуждение	19
2.4 Заключение	26
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	28
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	33

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ЛПЛМД - Лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия

FSHD - facioscapulohumeral dystrophy

МСК – мультипотентные стромальные клетки

SDF1 – stromal derived factor (хемокин CXCL12)

АФК – активные формы кислорода

C12TPP – додецилтрифенилфосфоний, фрагмент антиоксиданта SkQ1, лишенный антиоксидантной части

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Лице-плече-лопаточная мышечная дистрофия (ЛПЛМД, или FSHD) - это аутосомно-доминантное заболевание с частотой до 1:8000 [1]. В настоящее время это заболевание неизлечимо, лекарств против FSHD не существует. Клинические особенности FSHD, как правило, касаются мышц лица и верхних конечностей, но могут с возрастом каудально прогрессировать, поражая мышцы живота и нижних конечностей и ступней [2]. Основная форма лице-плече-лопаточной дистрофии (facioscapulohumeral dystrophy (FSHD1) является результатом комбинации трех мутаций в коротком плече хромосомы 4 (4q35): уменьшение количества D4Z4 повторов и двух полиморфизмов, 4qA161 и 4qA. Полиморфный сайт 4qA161 содержит участок прикрепления к ядерному матриксу и инсулятор, необходимые для контроля активности ряда генов, в том числе гена DUX4, в локусе 4q35. Повышенная экспрессия этих генов, в особенности DUX4, приводит к болезни. Транскрипционный анализ клеток FSHD показал дефекты в программе миогенной дифференцировки [3, 4, 5, 6, 7], репрессию генов, связанных с окислительным стрессом [6, 7, 8], экспрессию специфичных генов гладкомышечных клеток сосудов и эндотелиальных клеток [10], а также генов клеточного цикла [11]. Транскриптомный анализ, проведенный многими группами, идентифицировал несколько транскриптомных сигнатур клеток FSHD. Однако, только несколько генов являются общими среди этих сигнатур, что предполагает, что дефекты FSHD находятся на пост-транскрипционном и пост-трансляционном уровне регуляции генов. Эктопическая экспрессия нескольких субтеломерных 4q35 генов в тканях мыши или иммортализованных миобластах, культивируемых *in vitro*, воспроизводит некоторые особенности FSHD, предполагая, что несколько генов могут способствовать фенотипу FSHD. В частности, было показано, DUX4 ингибирует миогенную дифференцировку, и вызывает окислительный стресс [12, 13] и атрофию миобластов, культивируемых in vitro [14]. И, наконец, гиперэкспрессия FRG1 в мышцах мышей индуцировала атрофию мышц [15]. Однако ни одна из этих клеточных моделей не может воспроизвести полный фенотип первичных миобластов, выделенных из больных FSHD.

Для пораженных FSHD мышц характерно замещение мышечной ткани жировой и соединительной тканью. Механизмы такого замещения не выявлены. Мы предполагаем, что нарушение процессов регенерации мышечных волокон и воспаление может быть одной из причин замещения мышечной ткани при FSHD соединительной и жировой тканью. Исследований, направленных на выяснение прямых клеточных взаимодействий и участия цитокинов и их рецепторов в этом процессе ранее не было. Понимание

молекулярно-клеточных механизмов развития патологии FSHD необходимо для разработки новых терапевтических подходов для лечения или коррекции этого заболевания. Следует отметить, что социальная необходимость разработки новых способов лечения FSHD связана с высокой инвалидизацией экономически активных пациентов. Эффективных способов коррекции и лечения, позволяющих значительно повысить качество жизни и, хотя бы частично, восстановить трудоспособность пациентов, страдающих от FSHD, на сегодня не существует.

Цель настоящего проекта - понять механизмы возникновения дефектов миогенеза под действием генов, вовлеченных в FSHD и использовать полученные знаний для разработки подходов к лечению этого заболевания.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Раздел 1. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МСК И МИОБЛАСТОВ НА *IN VITRO* МОДЕЛИ ЛИЦЕ-ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

1.1 Введение

Среди цитокинов хемокины представляют собой небольшие белки (7-14 кДа) с хемоаттрактантными свойствами, первоначально обнаруженной ролью которых являлось привлечение иммунных клеток к очагам воспаления [16, 17]. Однако последующие исследования показали, что сигнальный путь хемокинов также участвует в миграции нейронов, клеток нервного гребня и половых клеток во время эмбрионального развития, регулирует паттерн и ремоделирование сосудистой системы и привлекает раковые клетки к отдаленным участкам во время метастазирования [18, 19, 20]. Дисрегулирование передачи сигналов CXCR4 - CXCL12 связано с многочисленными патологическими состояниями, включая различные виды рака, хронические воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и иммунодефициты [21]. На МСК, трансдуцированных ретровирусным вектором, содержащим CXCR4, было показано, что такие MCK мигрируют к SDF1 как минимум в 3 раза сильнее, чем контрольные MCK. Таким образом, ось SDF1-CXCR4 стимулирует миграцию клеток МСК в условиях in vitro [22]. Повышение миграционной способности было показано и на нативных МСК костного мозга [23]. В [24] показано, что избыточная экспрессия DUX4 исследовании было в иммортализованных миобластах человека (трансфекция DUX4) приводит к увеличению в них экспрессии CXCR4 и SDF1, а анализ миграции показал, что MCK костного мозга мигрируют к трансфицированным DUX4 миобластам больше, чем в контроле. Таким образом, DUX4 может контролировать миграцию MCK костного мозга через CXCR4-SDF1 взаимодействие [24]. В нормальных взрослых тканях человека полноразмерный DUX4 экспрессируется только в семенниках (в соматических тканях в небольших количествах - случайные вспышки экспрессии) [25]. В исследовании Снайдер с соавторами показали, что ретроген DUX4 обычно экспрессируется в семенниках, первичных половых клетках и плюрипотентных стволовых клетках. Экспрессия DUX4 эпигенетически подавляется в дифференцированных тканях, а остаточные транскрипты DUX4 сращиваются для удаления карбокситерминального домена, который связан с токсичностью для клеток [25]. Авторы обнаружили, что у лиц с ЛПЛМД экспрессия полноразмерного транскрипта DUX4 не полностью подавляется в скелетных мышцах и, возможно, в других дифференцированных тканях, и приводит к небольшому проценту

клеток, экспрессирующих относительно большое количество полноразмерной мРНК DUX4 и белка. Таким образом, экспрессия DUX4 может быть обнаружена в мышечных клетках и тканях и, оказывая токсический эффект, она способствует патологическому фенотипу, индуцируя апоптоз, вызывая чувствительность к окислительному стрессу и ингибируя миогенную дифференцировку [25]. Кроме того, показано, что сателлитные экспрессирующие человеческий DUX4, клетки мыши, неспособны правильно дифференцироваться in vitro [26] и регенерировать ткань скелетных мышц in vivo [27]. Ингибирование миогенной программы DUX4 можно объяснить сходством сайтов DUX4 Pax3/7, распознавания факторов транскрипции И необходимых для коммитирования миогенных предшественников, что предположительно и приводит к нарушениям ранних стадий миогенной дифференцировки [12].

CXCR4 участвует в регуляции миогенной дифференциации, также ОН экспрессируется на поверхности как пролиферирующих, так и дифференцированных клеток C2C12 [28, 29]. Известно, что экспрессия SDF1 увеличивается, а CXCR4 снижается во время миогенной дифференциации миобластов крыс [30]. Однако роль оси CXCR4-SDF1 в миогенной дифференцировке остается спорной. В некоторых сообщениях показано ингибирование миогенной дифференцировки с помощью SDF1 сигнализации СХСR4 [29, 31]. Другие данные показали, что SDF1 индуцирует образование миотубул, а ингибирование CXCR4 через siRNA блокировало дифференцировку линии миобластов C2C12 [32]. Исследование [29] показало, что SDF1-CXCR4 не только индуцирует миграцию миогенных предшественников / миобластов, но также способствует их распространению и, кроме того, ингибирует их миогенную дифференцировку путем изменения экспрессии миогенина (SDF1 ингибирует экспрессию миогенина в первичных миобластах), MyoD и MHC (myosin heavy chains), а так же оказалось, что SDF1-CXCR4 влияет на миграцию, пролиферацию и дифференцировку миогенных предшественников и миобластов через атипичную РКС [29].

Суммируя вышесказанное, SDF1-CXCR4 ось сигнализации, которая имеет ключевую роль в развитии и регенерации мышц, возможно, активируется под действием DUX4 и участвует в развитии патологии при ЛПЛМД.

Также показано, что пораженные мышцы пациентов с ЛПЛМД инвазированы макрофагами и Т-клетками [33], что свидетельствует о процессе воспаления в пораженных мышцах. Анализ транскриптома мышечных биопсий больных ЛПЛМД выявил в пораженных мышцах увеличенный уровень экспрессии белков, связанных с

неспецифическим ответом на воспаление, такими, как CXCL9, CXCL10, CXCL11 [34]. Вероятно, такой ответ является фактором аттракции как клеток воспаления, так и МСК в область пораженных мышц. Эти факты могут свидетельствовать о нарушении клеточных механизмов регенерации мышц. На сегодняшний день механизм взаимодействия SDF1 и его рецептора CXCR4 достаточно подробно описан в эмбриогенезе, при взаимодействии гемопоэтических стволовых клеток и МСК, при метастазировании ряда опухолей. Однако, роль этой сигнальной оси при патологическом процессе, таком, как мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина, остается неизученной.

Целью раздела работы является анализ экспрессии генов хемокинов и рецепторов в модельных системах FSHD и исследование механизмов миграции клеток при моделировании FSHD *in vitro*.

1.2 Материалы и методы

В работе использовали четыре культуры иммортализованных миобластов: две от здоровых и две от больных ЛПЛМД доноров, а также миобласты от здоровых доноров с индуцируемой экспрессией DUX4. Иммортализация миобластов проводилась по стандартному протоколу в Институте миологии (Париж). В качестве контроля использовали культуры первичных миобластов от больных и здоровых доноров. Также в работе использовали МСК, выделенные из жировой ткани. Первичные миобласты и МСК были взяты из «коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» ИБР РАН.

1.2.1 Культивирование клеток.

МСК культивировали во флаконах с поверхностью роста клеток 75 и 150 см² в среде для пролиферации, состоящей из α -MEM (Панэко), 10% FBS (HyClone) и добавок: инсулин-трансферин-селенит (Gibco), Glutamax (Gibco). Миобласты культивировали во флаконах с поверхностью роста клеток 75 и 150 см2 в среде для пролиферации, состоящей из 4 частей DMEM (Панэко) и 1 части среды 199 (Gibco) с добавлением 15% FBS, 0,01M HEPES (Gibco), 1XGlutamax, 10 мг/л bFGF (Peprotech), 0,1 мкМ/л дексаметазона (Sigma) и 50 Ед./мл пенициллина, 50мкг/мл стрептомицина (Gibco) Клетки культивировали в CO2-инкубаторе при 37°C, 5% CO². МСК пассировали по достижении монослоя, миобласты пассировали по достижении 50% монослоя с помощью растворов Версена (Панэко) и 0,05% трипсина-EDTA (Gibco).

1.2.2 Анализ миграции МСК.

Миграцию МСК исследовали при помощи клеточного анализатора в реальном времени xCELLigence DP с использованием плат для миграции CIM-plate. Анализ проводили в течение 25 часов. Также миграцию МСК исследовали в системе Transwell (Corning) в 24 луночных плато, со вставками с диаметром пор 8 мкм. В нижнюю камеру наливали по 550 мкл кондиционированной миобластами среды или среду для миобластов, содержащую 2% FBS. В качестве положительного контроля использовали среду, содержащую 10% FBS. В верхнюю камеру высевали МСК в количестве 10⁴ (или 10*4) клеток, через 6 часов после посадки верхнюю камеру вставляли в нижнюю камеру системы и культивировали в течение 24 часов в СО2-инкубаторе. Затем клетки отмывали раствором PBS, фиксировали 10 мин в 4% ПФА, при помощи ватной палочки удаляли клетки с внутренней поверхности мембраны, аккуратно вырезали мембрану, клетки на стороне мембраны окрашивали DAPI (Sigma) И анализировали нижней на флуоресцентном микроскопе КЕҮЕNCE BZ-9000 (BIOREVO). Подсчет ядер проводили не менее, чем в 5 полях зрения. Для анализа механизма миграции МСК использовали синтетический ингибитор рецептора CXCR4 - AMD3100 (Sigma), в концентрации 10 мМ, или нейтрализующие антитела к SDF1α (ab9797, Abcam) в концентрации 10 нг/мл.

1.2.3 Проточная цитометрия.

Миобласты и МСК снимали с пластика при помощи растворов Версена и 0,05% трипсин-EDTA. Отмывали от фермента в PBS центрифугированием в течение 10 мин при 300g. Клетки фиксировали в растворе Cytofix (BD Biosciences) в течение 20 мин при +4°C, отмывали трижды BPS. После последней отмывки клетки ресуспендировали в первых антителах, разведенных в блок-растворе в соотношении 1/100 и инкубировали в течение ночи при +4°C. Затем трижды отмывали от первых антител PBS, после последней отмывки клетки ресуспендировали во вторых антителах, конъюгированными с флуорохромом Alexa и инкубировали в течение 60 мин в темноте. Для контроля неспецифического связывания вторых антител использовали пробы без первых антител. Отмывали от вторых антител и анализировали пробы на проточном цитометре Attune NxT.

1.2.4 Анализ экспрессии генов.

Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen) по протоколу производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf). Образцы РНК хранили при -70°C. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген) по протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили на

амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio Rad) (1 час при 37°С, затем 10 минут при 70°С). Полученную кДНК использовали для Real-time PCR. Образцы кДНК хранили при -20°С. ПЦР в реальном времени проводили в объеме 10 мкл/лун в 96 луночной плате. Реакционная смесь для одной лунки состояла из 2 мкл 5X HS-SYBR, 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера (Таблица 1), 1 мкл воды и 5 мкл кДНК. Для каждого образца выполнялось 3 повторения. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad), соединённом с компьютером, программой "Bio-Rad CFX Manager" версии 3.0, по схеме: 95°С 10 минут (нагрев смеси, предварительная денатурация, активация ДНК-полимеразы) и 40 циклов [95°С 15 секунд (денатурация) + 60°С 1 минута (отжиг и элонгация)]. Перед реакциями плата были запечатаны плёнкой на приборе РХ1 РСR Plate Sealer или стрипами. Относительные уровни экспрессии (RQ) были вычислены по отношению к GAPDH:

Обозна-	Специфициости	Последовательность	Последовательность		
чение		прямого праймера	обратного праймера		
ECE	Фактор роста	AGAAGAGCGACCCTC	CGGTTAGCACACACTC		
гог	фибробластов	ACATCA	CTTTG		
SDF1	IIumowuu CVCI 12	ACATGGCTTTCGAAG	GCTGGTCCTCGTGCTG		
	цитокин САССТ2	AATCG	AC		
CYCI 5	Vovoruu CVCI 5	AGCTGCGTTGCGTTTG	TGGCGAACACTTGCAG		
CACLS	ЛЕМОКИН СЛСЦЭ	TTTAC	ATTAC		
CXCL11	Vovoruu CVCI 11	GACGCTGTCTTTGCAT	GGATTTAGGCATCGTT		
	ЛЕМОКИН СЛССТТ	AGGC	GTCCTTT		
	Матриксная	GGGGCTTTGATGTACC	TGTCACACGCTTTTGG GGTTT		
MMP1	металло-протеиназа	CTAGC			
	1	CIAGE			
MMP2	Матриксная	GATACCCCTTTGACGG	CCTTCTCCCAAGGTCC		
	металлопротеиназа 2	TAAGGA	ATAGC		
TIMP1	Ингибитор	AGAGTGTCTGCGGAT	CCAACAGTGTAGGTCT		
	металлопротеиназ 1	ACTTCC	TGGTG		
TIMP3	Ингибитор	CAGGTCGCGTCTATGA	AGGTGATACCGATAGT		
	металлопротеиназ 3	TGGC	TCAGCC		
ANCDT1	Δυρμοπορτιμι	AGAACCTTCAAGGCTT	GGTGGTAGCTCTGTTT		
ANOITI	Ангиопоэтин	GGTTAC	AATTGCT		
CTGF	Фактор роста	AAAGTGCATCCGTA	CCGTCGGTACATACTC		
	соединительной	CTCCCA	CACAG		
	ткани	CIECCA			
CCL2	Hutoruu CCI 2	CAGCCAGATGCAATC	TGGAATCCTGAACCCA		
	цитокин ССС2	AATGCC	СТТСТ		
CCL11	Hutokuh CCI 11	CCCCTTCAGCGACTAG	TCTTGGGGTCGGCACA		
	циюкин ссли	AGAG	GAT		
GAPDH	Глицеральдегид-3-	TGCACCACCAACTGCT	GGCATGGACTGTGGTC		
	фосфат	TAGC	ATGAG		
	дегидрогеназа	11100	1110/10		

таолица. 1 праимеры, использованные в работе (синтезированы в компании Еврог	Таблица.	1.	- Праймер	ы, использованные в	работе	(синтези	рованы	в компании	Евро	оген
--	----------	----	-----------	---------------------	--------	----------	--------	------------	------	------

1.2.5 Иммуноцитохимическое исследование

выполняли на иммортализованных и первичных миобластах с использованием антител. Клетки трижды промывали раствором PBS, затем фиксировали 4% ПФА либо этиловым или метиловым спиртом при +4°C в течение 15 мин, отмывали от фиксатора раствором PBS. Далее наносили первые антитела, разведенные в блок-растворе (PBS, 4% FBS, 0,1% Triton X-100), инкубировали в течение ночи при +4°C во влажной камере. Затем клетки отмывали раствором PBS и наносили вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом (Alexa) (также разведенные в блок-растворе в соотношении 1:1000), инкубировали 1 час в темноте при комнатной температуре. После чего проводили отмывку раствором PBS, окрашивали ядра DAPI (Sigma). Препараты изучали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus IX51 и флуоресцентном микроскопе KEYENCE BZ-9000 (BIOREVO).

1.3 Результаты и обсуждение

В работе мы исследовали миграцию МСК к кондиционированной миобластами среде. Миграцию клеток отслеживали в системе Transwell (вставки с диаметром пор 8 мкм) и с помощью клеточного анализатора XCelligence DP, позволяющего провести анализ в режиме реального времени. Показано, что факторы, секретируемые первичными и иммортализованными миобластами от больных доноров, стимулируют миграцию МСК в среднем в 1.5 раза больше по сравнению с миобластами от здоровых доноров (Рисунок 1.1). Усиленная миграция МСК может быть связана с повышенной концентрацией одного из основных хемокинов – цитокина SDF1a (или CXCL12). Мы использовали рекомбинантный SDF1α и показали, что при концентрации 100 нг/мл в среде SDF1α вызывает миграцию МСК сравнимую с миграцией к среде, содержащей 10% сыворотки (Рисунок 1.2). Для изучения механизма миграции МСК к кондиционированной миобластами среде мы использовали нейтрализующие SDF1α антитела и вещество AMD3100 – синтетический антагонист СХСR4 (рецептор SDF1α). Показано, что предварительное инкубирование кондиционированной миобластами среды с нейтрализующими антителами против SDF1α и обработка MCK ингибитором рецептора CXCR4 также снижает уровень миграции МСК, но не блокирует процесс миграции (Рисунок 1.2).



Рисунок 1.1 Влияние факторов, секретируемых миобластами на миграцию МСК: а диаграммы изменения клеточного индекса при миграции МСК к кондиционированной иммортализованными миобластами; б - диаграммы изменения клеточного индекса при миграции МСК к кондиционированной первичными миобластами; в – график изменения клеточного индекса в течение 25 часов



Рисунок 1.2 Анализ механизма миграции МСК к кондиционированной миобластами среде. IM norm – иммортализованные миобласты от здоровых доноров, IM FSHD - иммортализованные миобласты от больных доноров, SDF1α – рекомбинантный белок с концентрацией в среде 100 нг/мл, AMD3100 – антагонист рецептора CXCR4, anti-SDF1 – нейтрализующие антитела к SDF1α (результаты представлены как среднее значение±стандартное отклонение, * p<0.05, n=5)

Для количественной оценки уровня экспрессии SDF1α в миобластах мы использовали проточную цитометрию и показали, что базальный уровень экспрессии этого цитокина в иммортализованных миобластах от больных доноров в среднем на 50%

выше уровня экспрессии в миобластах от здоровых доноров (рисунок 1.3). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что миобласты от больных доноров стимулируют миграцию MCK, вероятно, за счет большей секреции SDF1α по сравнению с миобластами от здоровых доноров. Кроме того, показано, что рецептор CXCR4 на поверхности MCK так же вовлечен в процесс миграции.



Рисунок 1.3 Результаты проточной цитометрии по экспрессии SDF1α в иммортализованных миобластах: а - диаграмма экспрессии SDF1α в миобластах (MB FSHD – миобласты от больных доноров, MB норма – миобласты от здоровых доноров, * p<0,05, n=7); б – гистограмма проточной цитометрии 2-х культур миобластов.

Однако, SDF1α является не единственным фактором, вызывающим миграцию MCK, поскольку нейтрализация этого фактора антителами и блокирование CXCR4 на MCK снижали, но не блокировали миграцию.

Как уже было описано выше, при ЛПЛМД в пораженных мышцах имеет место процесс воспаления [38, 39], поэтому мы предположили, что в миобластах от больных доноров и образованных ими миотубулах изменяется уровень экспрессии некоторых белков, ассоциированных с воспалением. С помощью ПЦР анализа мы показали (рисунок 1.4):

 повышенный уровень экспрессии в миотубулах от больных доноров по сравнению с миотубулами от здоровых доноров белков внеклеточного матрикса (ММР2-в 2 раза, TIMP3-в 3 раза), цитокина SDF1α - в 11 раз, факторов роста (ангипоэтин 1- в 4 раза, bFGF - в 1,5 раза, CTGF - в 2 раза);

 повышенный уровень экспрессии в миобластах от больных доноров по сравнению с миобластами от здоровых доноров MMP2 и ангиопоэтина1- в 3 раза, SDF1α в 26 раз;

Известно, что пораженные ЛПЛМД мышцы инвазированы Т-клетками (Т4 и Т8), Вклетками, макрофагами, NK-клетками, нейтрофилами [35, 36], что свидетельствует о развитии воспалительного процесса. Ранее было показано, что провоспалительный цитокин TNFa высоко экспрессируется в поврежденной мышце и что он секретируется не только воспалительными клетками, но также самими миобластами и миотубулами [37]. Мы предположили, что TNFα является не единственным провоспалительным фактором и это предположение нашло подтверждение в нашем исследовании. Мы показали, что в миобластах и миотубулах от больных доноров выявлена увеличенная экспрессия ряда белков внеклеточного матрикса, цитокинов и факторов роста по сравнению с клетками от здоровых доноров, что, вероятно, связано с провоспалительным статусом миобластов от больных доноров. Однако воспаление сложный процесс, в котором задействованы различные типы клеток, поэтому нельзя рассматривать миобласты обособлено. Итак, при ЛПЛМД дегенеративный процесс включает в себя воспаление и значительную экспансию фиброадипогенных предшественников, что приводит к замещению пораженной мышечной ткани соединительной и жировой (фиброзу) [38, 39]. Известно, что в очаг воспаления мигрируют мультипотентные стволовые клетки (МСК) [40]. Наше исследование показало, что усиленная миграция МСК может быть связана с повышенной концентрацией одного из основных хемокинов – цитокина SDF1α (или CXCL12), так как предварительное инкубирование кондиционированной миобластами среды с нейтрализующими антителами против SDF1α снижает уровень миграции MCK. Более того, мы показали, что базальный уровень экспрессии SDF1α в иммортализованных миобластах от больных доноров выше уровня экспрессии в миобластах от здоровых доноров, а факторы, секретируемые первичными и иммортализованными миобластами от больных доноров, стимулируют миграцию МСК сильнее, чем секретируемые факторы миобластов от здоровых доноров. Таким образом, мы предполагаем, что миобласты от больных доноров стимулируют миграцию МСК, вероятно, за счет большей секреции SDF1a по сравнению с миобластами от здоровых доноров. Кроме того, показано, что рецептор СХСR4, расположенный на поверхности МСК так же вовлечен в процесс миграции, так как обработка МСК ингибитором рецептора СХСРА также снижает уровень миграции МСК [41, 42]. Повышенные уровни экспрессии SDF1α и CXCR4 являются потенциальными мишенями для терапии FSHD. Эффекторные системы CRISPR-Cas9 находят широкое применение в области стволовых клеток и регенеративной медицины. Каталитически неактивный Cas9, слитый с эффекторными доменами транскрипции хроматина, может обеспечивать ингибирование интересующей области генома. В рамках проекта в 2017 году нами был разработан метод, позволяющий быстро и эффективно определить эффективность и точность работы систем CRISPR-Cas9 [43]. В рамках настоящего проекта нами было проведено критическое сравнение разработанного нами метода с существующими методами [44].



Рисунок 1.4 Экспрессия мРНК bFGF, ANGPT1, SDF1, CTGF, MMP2, TIMP3 в миобластах и миотубулах (результаты представлены как среднее значение±стандартное отклонение, * p<0.05, n=3). МВ – миобласты, МТ – миотубулы 1.4 Заключение

Поставленные в нашей работе задачи выполнены. Мы показали, что миобласты от больных доноров имеют провоспалительный фенотип, синтезируют и секретируют в большем количестве хемокин SDF1a, что вызывает усиленную миграцию MCK [57, 58]. Рецептор CXCR4 на поверхности МСК вовлечен в механизм миграции МСК к миобластам. Сравнение результатов, полученных на первичных и иммортализованных миобластах от больных FSHD и здоровых доноров, указывает на то, что иммортализация миобластов не меняет их фенотипические характеристики. Таким образом, иммортализованные миобласты могут быть адекватным инструментом для исследований, в частности исследований молекулярно-клеточных механизмов развития FSHD.

Раздел 2. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА DUX4 В ГЕНЕРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ В ПАТОГЕНЕЗЕ FSHD1, А ТАКЖЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТКАХ *IN VITRO*

2.1 Введение

Окислительный стресс, в основном за счет активных форм кислорода (АФК), производимых митохондриями, является характерной особенностью FSHD. Недавнее исследование показало многообещающие эффекты антиоксидантов на пациентов FSHD [45]. Поскольку митохондрии участвуют в патогенезе FSHD и уровень, по меньшей мере, одного митохондриального белка, ANT1 повышен при FSHD [8], использование митохондриально-направленных антиоксидантов способных снижать концентрацию активных форм кислорода является интересной стратегией лечения FSHD. Недавно был продемонстрирован позитивный эффект антиоксидантов на эффективность слияния миобластов и миогенной дифференцировки клеток FSHD [46].

Целью настоящей работы был выбор наилучшей комбинации митохондриальнонаправленного антиоксиданта в зависимости от времени его действия время действия и концентрации по способности корректировать дефекты дифференцировки клеток FSHD.

2.2 Материалы и методы

Работа проводилась на иммортализованных миобластах человека линии MB135 и иммортализованных миобластах человека линии MB135 с индуцибельной экспрессией DUX4-fl (линия MB135-DUX4). Обе линии любезно предоставлены Стефаном Дж. Тепскоттом, исследовательский центр Фреда Хатчинсона, Северный Сиэтл [47]. Клетки культивировали и миогенную дифференцировку проводили как описано в работе [47].

В работе использовали стандартные методы клеточной и молекулярной биологии:

Уровень экспрессии мРНК рекомбинантного DUX4-fl и ZSCAN4 определяли методом обратной транскрипции ПЦР в реальном времени.

Уровень экспрессии белка DUX4 определяли методом вестерн блоттинга.

Уровень внутриклеточных АФК измеряли методом проточной цитофлуориметрии с использованием CM-H2DCFD. Данные представлены в виде медианных значений ± минимальное и максимальное. Статистическую значимость определяли, используя H-критерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений; **** - р ≤ 0,00001.

Нарушения миогенеза оценивали методом световой микроскопии. Для приготовления препаратов на 2 сутки дифференцировки клетки фиксировали 4% параформальдегидом, последовательно окрашивали раствором Мей-Грюнвальд и Гематоксилином и высушивали на воздухе. Для морфометрической оценки миогенеза измеряли площадь миотубул. Миотубулами считали структуры, содержащие не менее 4 ядер, всего измерялась площадь не менее 150 миотубул в 5 полях зрения. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Статистическую значимость определяли, используя Н-критерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений; **** - р ≤ 0,00001.

2.3 Результаты и обсуждение

В работе были поставлены следующие задачи:

- Исследование роли гена DUX4 в генерации активных форм кислорода (АФК) и формировании состояния окислительного стресса;

- Исследование возможности коррекции патологии FSHD1 с использованием митохондриально-направленных антиоксидантов в клеточной системе;

- Исследование относительного вклада транскрипционной активности DUX4 и окислительного стресса в транскрипционном профиле FSHD миобластов.

В соответствии с заявленными планами мы исследовали роль АФК в нарушении слияния миобластов и развитии ЛПЛМД.

Мы использовали в работе линию иммортализованных миобластов человека MB135 с индуцибельной экспрессией DUX4-fl (линия MB135-DUX4) и контрольную к ней линию иммортализованных миобластов MB135. В этой модели экспрессия рекомбинантного кодон-замещенного DUX4-fl в клетках MB135-DUX4 включается добавлением антибиотика доксициклина. В работе было подтверждено, что в клетках MB135-DUX4 через 8 часов после добавления доксициклина экспрессия мPHK рекомбинантного DUX4-fl возрастает в 24100 раз (рисунок 2.1 A). В клетках MB135-DUX4 индетектировался методом вестерн-блоттинга только после индукции доксициклином в клетках MB135-DUX4 (рисунок 2.1 Б), что соответствует ранее опубликованным данным [47].

Затем мы оценили базовый и индуцированный уровни экспрессии мРНК транскрипционной мишени DUX4, ZSCAN4, в клетках MB135-DUX4 по сравнению с контролем (клетки MB135) (рисунок 2.2). После индукции экспрессии рекомбинантного DUX4 экспрессия ZSCAN4 возрастала в 2120000 раз (рисунок 2.2 А). Базовый уровень экспрессии ZSCAN4 был существенно повышен в линии MB135-DUX4 по сравнению с

линией MB135 (рисунок 2.2 Б), что указывало на неполное ингибирование экспрессии рекомбинантного DUX4 в клетках MB135-DUX4 в отсутствие индуктора.



Рисунок 2.1 Выявление рекомбинантного DUX4-fl в миобластах MB135 и MB135-DUX4. Для индукции экспрессии DUX4-fl клетки обрабатывали доксициклином (doxy) в течение 8 часов (в случае выявления мРНК (A)) или 18 часов (в случае выявления белка (Б)). (А) Результаты обратной транскрипции ПЦР в реальном времени; (Б) результаты вестерн-блоттинга.



Рисунок 2.2 Выявление мРНК транскрипционной мишени DUX4, hZSCAN4, в миобластах MB135 и MB135-DUX4. (А) Выявление мРНК hZSCAN4 в миобластах после индукции экспрессии DUX4-fl доксициклином (doxy); клетки обрабатывали доксициклином в течение 8 часов. (Б) Определение базового уровня мРНК hZSCAN4 в миобластах MB135 и MB135-DUX4. Результаты обратной транскрипции ПЦР в реальном времени.

Поскольку в миобластах у пациентов с ЛПЛМД DUX4 экспрессируется в отдельных клетках спорадически, общий уровень его экспрессии чрезвычайно низок, а в

некоторых биопсиях он вовсе не детектируется [7,39], мы провели работу на контрольных клетках MB135-DUX4 с неполным ингибированием экспрессии рекомбинантного DUX4fl. Ранее было показано, что транзитная экспрессия DUX4 в иммортализованных миобластах человека линии LHCN-M2 вызывает окислительный стресс [46]. Мы оценили общий уровень АФК методом проточной цитофлуориметрии с использованием СМ-H2DCFDA в клетках MB135 и MB135-DUX4. Базовый уровень АФК был выше в клетках MB135-DUX4, чем в клетках MB135 (рисунок 2.3), что вероятно связано с неполным ингибированием экспрессии рекомбинантного DUX4 в контрольных клетках MB135-DUX4. Обработка пролиферирующих миобластов MB135-DUX4 антиоксидантами в течение 4 дней приводила к значительному снижению в них уровня внутриклеточных АФК. Были использованы как антиоксиданты общего действия Trolox (водорастворимый аналог токоферола), (наиболее эффективная концентрация 100мкМ) и Tempol (4 гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин 1-оксил), (наиболее эффективная концентрация 100мкМ), так И митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (10-(6'пластохиноил) децил-трифенилфосфоний, (наиболее эффективная коцентрация 20 нМ) (рисунок 2.3). Это указывало на существенный вклад митохондрий в производство общих внутриклеточных АФК в клетках с повышенной экспрессией DUX4.



Рисунок 2.3 Определение уровня внутриклеточных АФК в миобластах MB135 с индуцибельной экспрессией DUX4. Данные представлены в виде медианных значений ± минимум и максимум. За 100% в каждом опыте принимали среднее значение флуоресценции CM-H2DCFD в клетках MB135. Статистическую значимость определяли, используя H-критерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений; * - p ≤ 0,05; ** - p ≤ 0,001; *** - p ≤ 0,0001; **** - p ≤ 0,0001; ****

Ранее на иммортализованных миобластах человека линии LHCN-M2 с транзитной экспрессией DUX4 было показано, что антиоксиданты общего действия NAC (Nацетилцистеин) и Tempol отчасти компенсируют дефекты дифференцировки миобластов в миотубулы. Сейчас мы протестировали панель антиоксидантов общего действия (NAC, Tempol, Trolox, а также митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 по их способности восстанавливать нормальную структуру миотубул, формирующихся из миобластов MB135-DUX4 с низким уровнем экспрессии DUX4. DUX4-fl вызывает атрофию миотубул и для ее оценки обычно измеряется толщина миотубул в 3 местах [46]. Однако миотубулы, как правило, имеют неправильную форму, поэтому результат такой оценки сильно зависит от исследователя. Чтобы избежать невольной ошибки и увеличить точность оценки, мы измеряли площади миотубул. Миотубулами считали структуры, содержащие не менее 4 ядер, всего измерялась площадь не менее 100 миотубул для каждого препарата, перед измерением все препараты были зашифрованы и расшифрованы уже после получения результатов. Контрольные миобласты МВ135 формировали выраженные миотубулы уже на 2 день дифференцировки (рисунок 2.4). В этих условиях миобласты MB135-DUX4 с низким уровнем экспрессии DUX4 формировали миотубулы с заметно меньшей площадью, чем контрольные (рисунок 2.4). Клетки MB135-DUX4 с оверэкспрессией DUX4 вызванной доксициклином не образовывали миотубул на 2 день дифференцировки (рисунок 2.4).



Рисунок 2.4 Экспрессия DUX4 нарушает миогенез миобластов MB135. (А) Типичные изображения культур на 2 день дифференцировки. (Б) Морфометрический анализ. Измерение средней площади миотубул. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Статистическую значимость определяли, используя Hкритерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений; **** - р ≤ 0,00001. (В) Распределения для MB135 и MB135-DUX4

Было показано, что добавление антиоксидантов (и общего действия и митохондриально-направленных) к контрольным миобластам MB135 не только не приводило к увеличению средней площади миотубул, но немного и незначимо ее снижало (не показано). Добавление антиоксидантов (и общего действия и митохондриально-

направленных) к миобластам MB135-DUX4 способствовало увеличению площади образующихся из них миотубул (рисунок 2.5). На рисунке 2.5 представлены результаты действия оптимальных концентраций антиоксидантов. [48, 49].

Оказалось, что С12ТРР в концентрации 20 нМ также был эффективен (рисунок 2.5). Известно множество примеров терапевтического и геропротекторного действия «мягкого» разобщения [50, 51, 52, 53, 54, 55]. Недавно нами было показано, что длительное слабое («мягкое») разобщение может существенно менять структуру и физиологию митохондрий и таким образом делать клетку более устойчивой к различным [48, 56]. воздействиям (например, воспалительным цитокинам) Механизм физиологического действия «мягкого» разобщения до конца не понятен. В рамках генеральной гипотезы благотворное действие малых доз разобщителей в разных моделях объясняется их способностью снижать уровень мито-АФК [50, 53]. Однако нельзя исключать и других возможных механизмов, таких как улучшение «контроля качества» митохондрий за счет активации митофагии, а также активации энергетических сенсоров (таких как AMPK), регулирующих целый ряд клеточных ответов. Действие SkQ1 и С12ТРР подтверждает важную роль митохондрий в регуляции миогенеза, а также указывает на их участие в нарушении миогенной дифференцировки при ЛПЛМД.

Α **MB135-DUX4** MB135-DUX4 MB135-DUX4 SkQ1 20nM SkQ1 40nM **MB135-DUX4** MB135-DUX4 **MB135-DUX4** Tempol 100mkM C12TPP 20nM Trolox 100mkM В Б 20000 150-MB135 Number of values MB135-DUX4 15000 100-Area, μm² MB135-DUX4 + SkQ1 20nM 10000 50 5000 NB135DUAA*COIPP 201M NE135DUXA*Tempo 100mM NB135DUVA TOOOT DOMM N81350UX4 * 5KQ1 20MM MB1350UVA* SKOLADIM **Bin Center**

Рисунок 2.5 Антиоксиданты частично восстанавливают нарушенную DUX4 способность миобластов MB135-DUX4 к формированию миотубул. (А) Типичные изображения культур на 2 день дифференцировки. (Б) Морфометрический анализ. Измерение средней площади миотубул. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Статистическую значимость определяли, используя Н-критерий Краскела — Уоллиса и последующий тест Данна для множественных сравнений; **** - р ≤ 0,00001. (В) Распределения для MB135, MB135-DUX4 и MB135-DUX4 с SkQ1.

2.4 Заключение

В результате анализа уровня экспрессии транскрипционных мишеней DUX4 и способности миобластов к миогенной дифференцировке было показано, что клетки линии MB135-DUX4 без дополнительной индукции экспрессии DUX4 являются релевантной in vitro моделью FSHD1. Поставленные задачи выполнены. Показано, что низкоуровневая экспрессия DUX4 приводит к усилению генерации АФК в миобластах. В миобластах с низкоуровневой экспрессией DUX4 значительная доля АФК генерируется митохондриями. Антиоксиданты, в том числе митохондриально-направленные в значительной степени восстанавливают нарушенную низкоуровневой экспрессией DUX4 миогенную Липофильный дифференцировку. катион С12ТРР также в значительной степени восстанавливают нарушенную низкоуровневой экспрессией DUX4 миогенную дифференцировку

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты расширяют понимание молекулярно-клеточных механизмов развития патологии ЛПЛМД и могут быть основой для разработки новых способов лечения и/или коррекции данного заболевания.

Миобласты от больных ЛПЛМД доноров имеют больший уровень экспрессии белков, связанных с воспалением. Усиленная секреция хемокина SDF1α миобластами от больных доноров стимулирует миграцию MCK.

Низкоуровневая экспрессия DUX4 в миобластах приводит к усилению генерации митохондриями АФК. Определены условия применения антиоксидантов, в том числе митохондриально-направленных, позволяющих восстанавливать миогенную дифференцировку миобластов с фенотипом ЛПЛМД.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Deenen J.C., Arnts H., van der Maarel S.M., Padberg G.W., Verschuuren J.J., Bakker E., Weinreich S.S., Verbeek A.L., van Engelen B.G. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy//Neurology - 2014.- Vol 16, No. 83. P. 1056 - 1059.

2 Tawil R., van der Maarel S.M., Tapscott S.J. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology//Skelet Muscle – 2014. Vol. 10, No. 4. P. 12.

3 Bakay M., Wang Z., Melcon G., Schiltz L., Xuan J., Zhao P., Sartorelli V., Seo J., Pegoraro E., Angelini C., Shneiderman B., Escolar D., Chen Y.W., Winokur S.T., Pachman L.M., Fan C., Mandler R., Nevo Y., Gordon E., Zhu Y., Dong Y., Wang Y., Hoffman E.P. Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration//Brain - 2006. - Vol. 129, No. 4. P. 996 - 1013.

4 Celegato B., Capitanio D., Pescatori M., Romualdi C., Pacchioni B., Cagnin S., Viganò A., Colantoni L., Begum S., Ricci E., Wait R., Lanfranchi G., Gelfi C. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes//Proteomics - 2006. - Vol. 6, No. 19. P. 5303 - 5321.

5 van Overveld P.G., Lemmers R.J., Sandkuijl L.A., Enthoven L., Winokur S.T., Bakels F., Padberg G.W., van Ommen G.J., Frants R.R., van der Maarel S.M. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy//Nat Genet - 2003. - Vol. 35, No 4. P. 315 - 317.

6 Winokur S.T., Chen Y.W., Masny P.S., Martin J.H., Ehmsen J.T., Tapscott S.J., van der Maarel S.M., Hayashi Y., Flanigan K.M. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation//Hum Mol Genet - 2003. - Vol. 15, No. 12. P. 2895 - 2907.

7 Tsumagari K., Chang S.C., Lacey M., Baribault C., Chittur S.V, Sowden J., Tawil R., Crawford G.E., and Ehrlich M. Gene expression during normal and FSHD myogenesis//BMC Med. Genomics - 2011. - Vol. 4. P. 67.

8 Laoudj-Chenivesse D., Carnac G., Bisbal C., Hugon G., Bouillot S., Desnuelle C., Vassetzky Y., Fernandez A. Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle//J Mol Med (Berl) - 2005. - Vol. 83, No. 3. P. 216 - 224.

9 Winokur S.T., Barrett K., Martin J.H., Forrester J.R., Simon M., Tawil R., Chung S.A., Masny P.S., Figlewicz D.A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress//Neuromuscul Disord - 2003. - Vol. 13, No. 4. P. 322 - 333.

10 Osborne R.J., Welle S., Venance S.L., Thornton C.A., Tawil R. Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy//Neurology - 2007. - Vol. 20, No. 8. P. 569 - 577.

11 Cheli S., François S., Bodega B., Ferrari F., Tenedini E., Roncaglia E., Ferrari S., Ginelli E., Meneveri R. Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns//PLoS One - 2011. - Vol. 6, No. 6. P. e20966.

12 Bosnakovski D., Lamb S., Simsek T., Xu Z., Belayew A., Perlingeiro R., Kyba M. DUX4c, an FSHD candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation//Exp Neurol – 2008. - Vol. 214, No. 1. P. 87 - 96.

13 Bosnakovski D., Xu Z., Gang E.J., Galindo C.L., Liu M., Simsek T., Garner H.R., Agha-Mohammadi S., Tassin A., Coppée F., Belayew A., Perlingeiro R.R., Kyba M. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies//EMBO J – 2008. – Vol. 22, No. 20. P. 2766 – 2779.

14 Vanderplanck C., Ansseau E., Charron S., Stricwant N., Tassin A., Laoudj-Chenivesse D., Wilton S.D., Coppée F., Belayew A. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression//PLoS One – 2011. – Vol. 6, No. 10. P. e26820.

15 Gabellini D., D'Antona G., Moggio M., Prelle A., Zecca C., Adami R., Angeletti B., Ciscato P., Pellegrino M.A., Bottinelli R., Green M.R., Tupler R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1//Nature – 2006. – Vol. 439, No. 7079. P. 973 - 977.

16 Oppenheim J.J., Zachariae C.O.C., Mukaida N. and Matsushima K. Properties of the Novel Proinflammatory Supergene "Intercrine" Cytokine Family//Annual Review of Immunology – 1991. – Vol. 9, No. 1. P. 617 – 648.

17 Guyon A. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems//Frontiers in Cellular Neuroscience – 2014. – Vol. 8. P. 65.

18 Cha Y. R., Fujita M., Butler M., Isogai S., Kochhan E., Siekmann A. F. and Weinstein B. M. Chemokine Signaling Directs Trunk Lymphatic Network Formation along the Preexisting Blood Vasculature//Developmental Cell – 2012. – Vol. 22, No. 4. P. 824 – 836.

19 Lewellis S. W. and Knaut H. Attractive guidance : How the chemokine SDF1 / CXCL12 guides different cells to different locations//Seminars in Cell and Developmental Biology – 2012. – Vol. 23, No. 3. P. 333 – 340.

20 Mayor R. and Theveneau E. The neural crest//Development – 2013. – Vol. 140, No. 11. P. 2247 – 2251.

21 Zirafi O., Kim K.A., Ständker L., Mohr K.B., Sauter D., Heigele A., Kluge S.F., Wiercinska E., Chudziak D., Richter R., Moepps B., Gierschik P., Vas V., Geiger H., Lamla M., Wei, T., Burster T., Zgraja A., Daubeuf F., Frossard N., Hachet-Haas M., Heunisch F., Reichetzeder C., Galzi J.L., Pérez-Castells J., Canales-Mayordomo A., Jiménez-Barbero J., Giménez-Gallego G., Schneider M., Shorter J., Telenti A., Hocher B., Forssmann W.G., Bonig H., Kirchhoff F. and Münch J. Discovery and Characterization of an Endogenous CXCR4 Antagonist//Cell Reports – 2015. – Vol. 11, No. 5. P. 737 – 747.

22 Bhakta S., Hong P. and Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation//Cardiovascular Revascularization Medicine – 2006. – Vol. 7. P. 19–24.

23 Ponte A.L., Marais E., Gallay N., Langonne A., Delorme B. and Herault O. et al. The In Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells : Comparison of Chemokine and Growth//Stem cells (Dayton, Ohio) – 2007. – Vol. 25. P. 1737– 1745.

24 Dmitriev P., Kiseleva E., Kharchenko O., Ivashkin E., Pichugin A., Dessen P., Robert T., Coppée F., Belayew A., Carnac G., Laoudj-Chenivesse D., Lipinski M., Vasiliev A., Vassetzky Y.S. Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis//Oncotarget – 2016. – Vol. 7, No. 40. P. 65090-65108.

25 Snider L., Geng L.N., Lemmers R.J., Kyba M., Ware C.B., Nelson A.M., Tawil R., Filippova G.N., van der Maarel S.M., Tapscott S.J., Miller D.G. Facioscapulohumeral dystrophy:

incomplete suppression of a retrotransposed gene//PLoS Genet – 2010. – Vol. 6, No. 10. P. e1001181.

26 Krom Y.D., Thijssen P.E., Young J.M., Hamer B.Den, Balog J., Yao Z., Maves L., Snider L., Knopp P., Zammit P.S., Rijkers T. van Engelen B.G., Padberg G.W., Frants R.R., Tawil R., Tapscott S.J., van der Maarel S.M. Intrinsic Epigenetic Regulation of the D4Z4 Macrosatellite Repeat in a Transgenic Mouse Model for FSHD//PLoS genetics – 2013. – Vol. 9, No. 4. P. e1003415.

27 Dandapat A., Bosnakovski D., Hartweck L.M., Arpke R.W., Baltgalvis K.A., Vang D., Baik J., Darabi R., Perlingeiro R.C.R., Hamra F.K., Gupta K. and Lowe D.A. Dominant Lethal Pathologies in Male Mice Engineered to Contain an X-Linked DUX4 Transgene//CellReports – 2014. – Vol. 8. P. 1484–1496.

28 Vasyutina E., Stebler J., Brand-saberi B., Schulz S., Raz E. and Birchmeier C. CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells//Genes and Development – 2005. – Vol. 19. P 2187–2198.

29 Ödemis V., Boosmann K., Dieterlen M.T. and Engele J. The chemokine SDF1 controls multiple steps of myogenesis through atypical PKC zeta//J Cell Sci – 2007. - Vol. 120, No. 22. P. 4050–4059.

30 Brzoska E., Kowalewska M., Markowska-zagrajek A., Kowalski K., Czarnecka-g M., Zimowska M., Grabowska I., Czerwi A.M. and Ja K. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells//Biol Cell - 2012. – Vol. 12. P. 722–737.

31 Hunger C. and Veysel O. Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration//Exp Cell Res – 2012. – Vol. 318, No. 17. P. 2178–2190.

32 Melchionna R., Carlo A.D.I., Mori R.D.E. and Cappuzzello C. Induction of myogenic differentiation by sdf-1 via cxcr4 and cxcr7 receptors//Muscle Nerve – 2010. – Vol. 41, No. 6. P. 828 – 835.

33 Hauerslev S., Sveen M.L., Vissing J. and Krag T.O. Protein Turnover and Cellular Stress in Mildly and Severely Affected Muscles from Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I//PLoS ONE – 2013. – Vol. 8, No. 6. P. e66929.

34 Arashiro P., Eisenberg I., Kho A.T., Cerqueira A.M.P., Canovas M., Silva H.C., Pavanello R.C.M., Verjovski-Almeida S., Kunkel L.M. and Zatz M. Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2009. – Vol. 106, No. 15. P. 6220–6225.

35 Tidball J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury//Medicine and Science in Sports and Exercise – 1995. – Vol. 27, No. 7. P. 1022–1032.

36 DeSimone A.M., Pakula A., Lek A. and Emerson C.P. Facioscapulohumeral muscular dystrophy//Comprehensive Physiology – 2017. – Vol. 7, No. 4. P. 1229–1279.

37 Collins R.A. and Grounds M.D. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice//J Histochem Cytochem – 2001. – Vol. 49, No. 8. P. 989–1001.

38 Mann C.J., Perdiguero E., Kharraz Y., Aguilar S. and Pessina P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle//Skeletal Muscle – 2011. – V. 1, No. 1. P. 21.

39 Bosnakovski D., Chan S.S.K.K., Recht O.O., Hartweck L.M., Gustafson C.J., Athman L.L., Lowe D.A., and Kyba M. Muscle pathology from stochastic low level DUX4 expression in an FSHD mouse model//Nat. Commun – 2017. - V 8. P. 550.

40 Marquez-Curtis L.A. and Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis//BioMed Research International - 2013.- Vol. 2013. P. 561098.

41 Latyeva O., Kiseleva E., Vassetzky Y. Applying of immortalized myoblasts for the study of the cellular mechanisms of the muscle tissue replacement by connective tissue in the in vitro model of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)//FEBS Open Bio – 2018. – Vol. 8. P. 153

42 Латыева О.О., Киселева Е.В., Васецкий Е. С. Роль взаимодействия МСК и иммортализованных миобластов при развитии фиброза на in vitro модели лице-лопаточноплечевой мышечной дистрофии//Сборник научных трудов V Международной конференции «Постгеном 2018»; редактор Говорун В.М.; Казанский ун-т; 2018. - С. 118

43 Germini D., Saada Y.B., Tsfasman T., Osina, K. Robin C.C., Lomov N., Rubtsov M., Sjakste N., Lipinski M., Vassetzky Y., et al. A One-Step PCR-Based Assay to Evaluate the Efficiency and Precision of Genomic DNA-Editing Tools//Mol. Ther. - Methods Clin Dev – 2017. – Vol. 5. P. 43–50.

44 Germini D., Tsfasman T., Zakharova V. V., Sjakste N., Lipinski M., and Vassetzky Y. A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing//Trends Biotechnol – 2018. – Vol. 36. P. 147–159.

45 Passerieux E., Hayot M., Jaussent A., Carnac G., Gouzi F., Pillard F., Picot M.C., Böcker K., Hugon G., Pincemail J., Defraigne J.O., Verrips T., Mercier J., Laoudj-Chenivesse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial//Free Radic Biol Med – 2015. – Vol. 81. P. 158-169.

46 Dmitriev P., Bou Saada Y., Dib C., Ansseau E., Barat A., Hamade A., Dessen P., Robert T., Lazar V., Louzada R.A.N., et al. DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients//Free Radic. Biol. Med. – 2016. – Vol. 99. P. 244–258.

47 Jagannathan S., Shadle S.C., Resnick R., Snider L., Tawil R.N., van der Maarel S.M., Bradley R.K., and Tapscott S.J. Model systems of DUX4 expression recapitulate the transcriptional profile of FSHD cells//Hum. Mol. Genet – 2016. – Vol. 25, No. 20. P. 4419-4431.

48 Romaschenko V.P., Zinovkin R.A., Galkin I.I., Zakharova V. V, Panteleeva A.A., Tokarchuk A. V, Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Chernyak B. V, and Popova E.N. Low Concentrations of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation Prevent Inflammatory Activation of Endothelial Cells by Tumor Necrosis Factor//Biochem – 2015. – Vol. 80, No. 5. P. 610–619.

49 Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vyssokikh M.Y., Pustovidko A. V., Markova O. V., Yaguzhinsky L.S., et al. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2010. – Vol. 107, No. 2. P. 663–668.

50 Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing//Exp. Gerontol. – 2000. – Vol. 35, No. 6-7. P. 811–820.

51 Brennan J.P., Berry R.G., Baghai M., Duchen M.R., and Shattock M.J. FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarization//Cardiovasc. Res. – 2006. Vol. 72, No. 2. P. 322–330.

52 Caldeira Da Silva C.C., Cerqueira F.M., Barbosa L.F., Medeiros M.H.G., and Kowaltowski A.J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity//Aging Cell – 2008. – Vol. 7, No. 4. P. 552–560.

53 Cunha F.M., Caldeira da Silva C.C., Cerqueira F. M., and Kowaltowski A.J. Mild Mitochondrial Uncoupling as a Therapeutic Strategy// Curr. Drug Targets - 2011. – Vol. 12, No. 6. P. 783–789.

54 Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Jankauskas S.S., Rokitskaya T.I., Chupyrkina A.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Isaev N.K., Antonenko Y.N., Skulachev V.P., et al. Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family//Biochem. Biokhimiia - 2012. – Vol. 77, No. 9. P. 1029–1037.

55 Sullivan P.G., Springer J.E., Hall E.D., and Scheff S.W. Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury//J. Bioenerg. Biomembr – 2004. – Vol. 36, No. 4. P. 353–356.

56 Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B. V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., and Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice//Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. – 2017. – Vol. 1863, No. 4. P. 968–977.

57 Dib C., Ma Y., **Kiseleva E.,** Karpukhina A., Popova E, Chernyak B, Vasiliev A., **Vassetzky E.S.** From molecular mechanisms to cell therapy of facio-scapulo-humeral dystrophy//Ontogenesis - II International CTERP Conference - Vol. 49, app. 4, - P. 3 - 54. DOI:10.1134/S0475145018010081.

58 Латыева О.О., Киселева Е.В., Васецкий Е.С. Использование иммортализованных миобластов для исследования механизмов развития фиброза в in vitro модели миодистрофии ландузи-дежерина//Сборник тезисов XIII международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых/ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, 2018. - С. 257.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД

*отчетные публикации по Государственному заданию 0108-2018-0008 Публикации в журналах

1 *Latyeva O., **Kiseleva E., Vassetzky Y**. Applying of immortalized myoblasts for the study of the cellular mechanisms of the muscle tissue replacement by connective tissue in the in vitro model of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)//FEBS OPEN BIO - 2018. - Vol. 8. - P. 153 - 153. WOS:000437674102149. (WoS, Scopus) – Q4. - IF 2,143.

2 *Germini D., Tsfasman T., Zakharova V.V., Sjakste N., Lipinski M., **Vassetzky Y.S**. A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing //Trends in Biotechnology – 2018. – Vol. 36, N. 2. - P. 147 - 159. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.008. (WoS, Scopus) – Q1. - IF 13.578.

Публикации в материалах конференций

3 Dib C., Ma Y., **Kiseleva E.,** Karpukhina A., Popova E, Chernyak B, Vasiliev A., **Vassetzky E.S.** From molecular mechanisms to cell therapy of facio-scapulo-humeral dystrophy//Ontogenesis - II International CTERP Conference - Vol. 49, app. 4, - P. 3 - 54. DOI:10.1134/S0475145018010081.

4 Латыева О.О., Киселева Е.В., Васецкий Е.С. Использование иммортализованных миобластов для исследования механизмов развития фиброза в in vitro модели миодистрофии ландузи-дежерина//Сборник тезисов XIII международной (XXII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых/ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, 2018. - С. 257.

5 Латыева О.О., Киселева Е.В., Васецкий Е.С. Роль взаимодействия МСК и иммортализованных миобластов при развитии фиброза на in vitro модели лице-лопаточноплечевой мышечной дистрофии//Сборник научных трудов V Международной конференции «Постгеном 2018»; редактор Говорун В.М.; Казанский ун-т; 2018. - С. 118.

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.