

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi042-A С ПОМОЩЬЮ
РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА,
АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ *c.1000G>A*
В ГЕНЕ *LRRK2*

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, b, c, *, &}, С. В. Павлова^{a, b, c, &}, А. А. Малахова^{a, b, c, &},
С. П. Медведев^{a, b, c}, Ю. М. Минина^a, Ю. В. Вяткин^d, Е. А. Хабарова^{a, e}, Дж. А. Рзаев^e,
Л. В. Коваленко^f, С. М. Закиян^{a, b, c}

^aФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055 Россия

^cФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
просп. акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

^dФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^eФГБУ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Немировича-Данченко, 132/1, Новосибирск, 630087 Россия

^fБУ ВО Сургутский государственный университет, просп. Ленина, 1, Сургут,
Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, 628403 Россия

*e-mail: evlana@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 08.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Поиск новых полиморфизмов, связанных с наследственными заболеваниями, важен для диагностики и изучения патологии развития болезни. Мы проанализировали клинический экзом пациента с болезнью Паркинсона и выявили полиморфизмы в генах *LRRK2* (*c.1000G>A*, *c.2167A>G*) и *PINK1* (*c.1562A>C*). Генетический вариант *LRRK2:c.1000G>A* имеет неопределенное клиническое значение и представляет интерес для дальнейшего изучения. Мы создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов. ИПСК (линия ICGi042-A) демонстрируют типичную морфологию и нормальный кариотип (46,XY), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) и способны продуцировать производные трех зародышевых листков.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полиморфизмы, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023010068, EDN: FRFNVG

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона вызвана гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции. Лишь 5% всех случаев болезни имеют генетическую

обусловленность. Для диагностики и изучения патологии развития болезни важен поиск новых полиморфизмов, ассоциированных с наследственными формами заболевания. После анализа клинического экзома 78-летнего пациента с болезнью Паркинсона нами были выявлены полиморфизмы

& Равный вклад авторов.

в генах *LRRK2* и *PINK1*. Уникальная технология индуцированной плюрипотентности позволяет создавать пациент-специфичные клеточные модели несущие генетические вариации (мутации, полиморфизмы), ассоциированные с наследственными заболеваниями. Преимуществом данных моделей является способность направленно дифференцировать полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) в узко-специализированный тип клеток, страдающий при определенных патологиях и изучать на дифференцированных клетках молекулярно-генетические механизмы заболевания *in vitro*, а также тестировать потенциальные фармпрепараты. Полученные в данном исследовании ИПСК (линия ICGi042-A) и ее нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения вклада нуклеотидных вариаций в генах *LRRK2* и *PINK1* в патогенез болезни Паркинсона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

Мононуклеарные клетки периферической крови, 1×10^6 МНК, трансфицировали набором эпсомных векторов (по 0.5 мкг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (Addgene ID № 41855–58, 41813–14) с использованием Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific или TFSscientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза и культивировали, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023).

Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали на чашки с покрытые внеклеточным матриксом Matrigel (Corning) в среде Essential 8 (TFSscientific) с 1% пенициллином-стрептомицином. Для пассирования ИПСК диссоциировали с помощью 0.5 мМ ЭДТА (Thermo Fisher Scientific) и пассировали в соотношении 1 : 8–1 : 10 с 2 мкМ тиазовивинном (STEMCELL Technologies) каждые 4–5 дней. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с использованием набора для очистки геномной ДНК Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Генетический анализ

Секвенирование клинического экзона проводили с использованием образца ДНК из пациент-специфичных МНК в компании “Генотек” (<https://www.genotek.ru>). Библиотека была создана с ис-

пользованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra (New England Biolabs) для Illumina после двойного штрих-кодирования с помощью NEBNext Multiplex Oligos для Illumina (New England Biolabs), контроль качества проводили с помощью Agilent Bioanalyzer 2100. Для обогащения библиотеки использовали SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies), секвенирование в режиме Rapid Run Mode. Необработанные считывания, полученные с Illumina HiSeq 2500, загружали в базу данных SRA (проект PRJNA563295, образец SAMN14446263, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/14446263>).

Полиморфизмы были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, праймеры целевого района приведены в табл. 1. Реакции проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) и следующей программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C в течение 30 с; 60°C в течение 30 с; 72°C в течение 30 с; и 72°C в течение 5 мин. Реакции секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на генетическом анализаторе ABI 3130XL в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмы и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР (95°C 5 мин; 35 циклов: 95°C 15 с, 60°C 15 с, 72°C 20 с) на амплификаторе S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Choppa et al., 1998; Okita et al., 2013). Праймеры перечислены в табл. 1.

Анализ кариотипа

Кариотипирование проводили, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

*Спонтанная дифференцировка *in vitro**

Потенциал дифференцировки *in vitro* анализировали с помощью формирования эмбриоидных тел, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (10 мин, при комнатной температуре (КТ)), пермеабилizировали 0.5% Тритон-Х100 (30 мин, КТ), инкубировали с 1% БСА (30 мин, КТ). Первичные антитела инкубировали в течение ночи при 4°C, вторичные антитела добавляли на 1.5–2 ч при комнатной температуре (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микрофотографии были сле-

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit IgG anti-OCT4	1 : 200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 500	Cell Signaling, 3579	RRID:AB_2195767
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti-aSMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-Collagen IV	1 : 100	LifeSpan Biosciences, LS-C79603	RRID:AB_2218107
	Rabbit IgG anti-NF200	1 : 1000	Sigma, N4142	RRID:AB_477272
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Rabbit IgG anti-GATA6	1 : 50	Cell Signaling Technology, 5851	RRID:AB_10705521
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID:AB_2535766
	Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	Бета-2-микроглобулин	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	NANOG	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCAAC
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Подтверждение генетического варианта	<i>LRRK2:c.1000G>A</i>	564 пн	ATAATCCTCCTCTCGTCTATTAGGT/ GCCATCTTCATCTCCAATCTTCTC
	<i>LRRK2:c.2167A>G</i>	491 пн	CTGACTCTAATTCTCATTTCCACTC/ GAGACTAAGTTGTAGAGATGCCT
	<i>PINK1:c.1562A>C</i>	466 пн	GAAGGGCATCAGTAGGAGATAGG/ CATTCACAGACCATCACGACACAG

ланы с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию 1 мкг РНК проводили с помощью ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix) с использованием программы: 95°C 5 мин; 40 циклов: 95°C 10 с, 60°C 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линии ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с использованием наборов AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Japan).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Паспорт клеточной линии ИПСК ICGi042-A представлен в табл. 2, полная характеристика этой линии приведена на рис. 1 и в табл. 3.

Клиническое экзомное секвенирование образца ДНК 78-летнего мужчины, больного болезнью Паркинсона, выявило вариации в генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона, *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C*. Полиморфизм *LRRK2:c.1000G>A* приводит к аминокислотной замене (p.Glu334Lys) и влияет на структуру одного из функциональных доменов богатой лейцином повторяющейся киназы 2 (*LRRK2*). Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови пациента трансфицировали неинтегрирующимися эписомными плазмидными векторами, экспрессирующими факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ИПСК (ICGi042-A) была подробно охарактеризована. Колонии клеток росли на пластике, обработанном белками экстраклеточного матрикса (Matrigel), демонстрировали типичную морфоло-

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi042-A
Альтернативное название линии	PD12-4Lm
Учреждение	ФГБУН Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 78 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2015 год
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2:c.1000G>A</i> , rs78501232 <i>LRRK2:c.2167A>G</i> , rs10878307 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных телец
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом внеклеточным матриксом Matrigel (Corning)
Среда культивирования	Essential 8 medium (ThermoFisherScientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	ЭДТА 0.5 мМ
Кратность пересева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi0042-A
Дата паспортизации/депонирования	24/08/2022

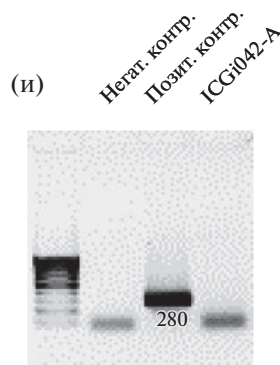
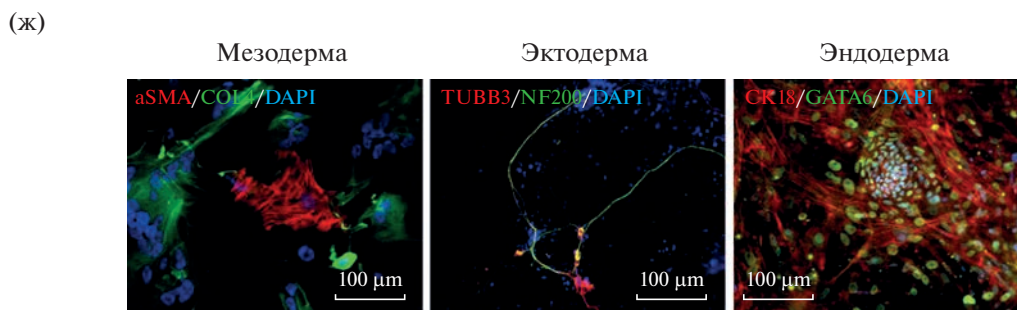
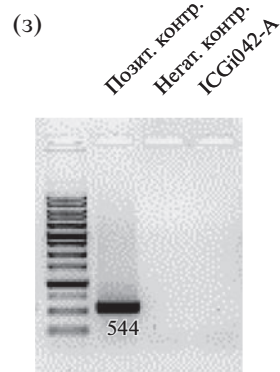
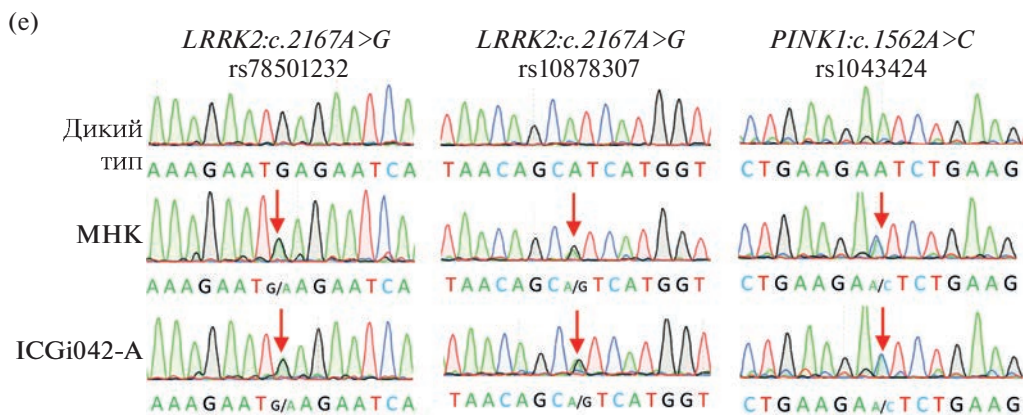
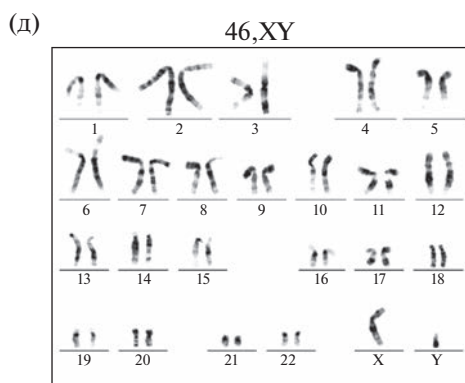
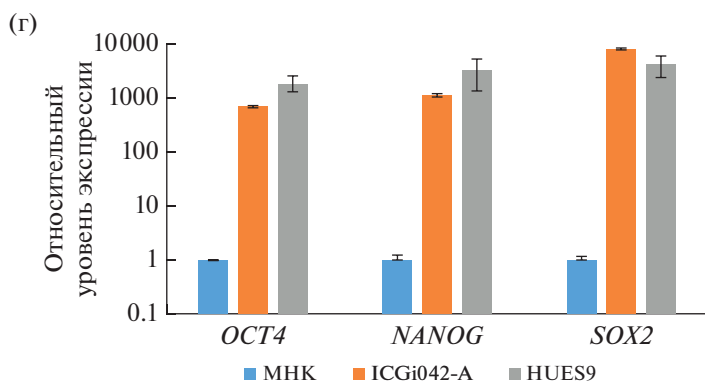
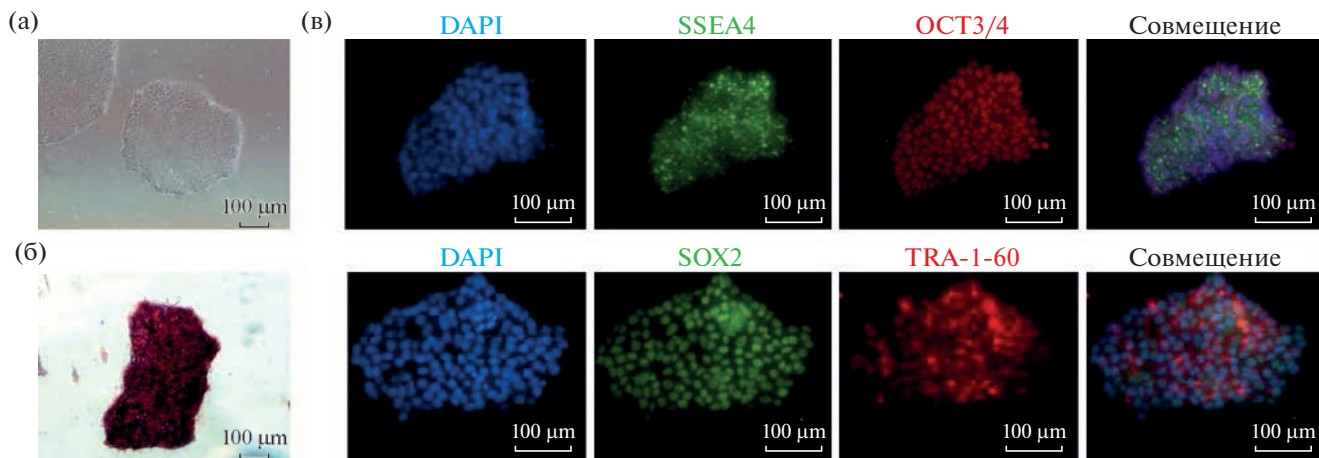


Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окрашивание на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, SOX2, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ПЦР в реальном времени</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности: NANOG, OCT4, SOX2	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с МНК	Данные доступны по запросу у авторов
Генотипирование	Секвенирование клинического экзема	<i>LRRK2:c.1000G>A</i> , rs78501232 <i>LRRK2:c.2167A>G</i> , rs10878307 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424	Данные секвенирования загружены в базу данных SRA (SAMN14446263)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие генетического варианта в гетерозиготном состоянии	Рис. 1е
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1и
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных телец, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и COL4 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); GATA6 и CK18 (энтодерма)	Рис. 1ж
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

←
Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека ICGi042-A. (а, б) Колонии клеток линии ICGi042-A, растущие на пластике, обработанном белками внеклеточного матрикса; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA4 (зеленый), TRA-1-60 (красный) на 18-м пассаже; (г) ПЦР в реальном времени маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) линии ИПСК ICGi042-A на 20-м пассаже, МНК пациента и линии ЭС клеток HUES9; (д) G-бэндинг линии ICGi042-A на 16 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY); (е) секвенограммы участков генов *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C* МНК пациента с БП, линии ИПСК ICGi042-A и здорового донора (дикий тип); (ж) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков: эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), нейрофиламент 200 (NF200)), мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), коллаген IV типа (COL4)), энтодермы (GATA6, кератин 18 (CK18)); (з, и) результаты ПЦР анализа; (з) эпизомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже; (и) на 19-м пассаже не было выявлено контаминации линии микоплазмами. Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки – 100 мкм.

гию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), были положительными по активности щелочной фосфатазы (рис. 1б) и интенсивно пролиферировали. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции SOX2 и OCT4, поверхностных антигенов TRA-1-60 и SSEA-4 на 18 пассаже (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG и SOX2 на 20 пассаже (рис. 1г). Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) служила положительным контролем (Cowan et al., 2004). G-бэндинг линии ICGi042-A на 16 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY) (было проанализировано 100 метафазных пластинок; рис. 1д). Полиморфизмы в генах *LRRK2:c.1000G>A*, *LRRK2:c.2167A>G* и *PINK1:c.1562A>C* были подтверждены секвенированием по Сэнгеру в линии ICGi042-A и сопоставлены с полиморфизмами в ДНК МНК (рис. 1е).

Способность полученной клеточной линии ICGi042-A дифференцироваться в три зародышевых листка была подтверждена спонтанной дифференцировкой *in vitro* посредством образования эмбриоидных тел. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина $\beta 3$ (TUBB3/TUJ1), нейрофиламента 200 (NF200)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), коллаген IV типа (COL4)), энтодермы (GATA6, кератин 18 (CK18)) (рис. 1ж). Эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 15 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линии ИПСК ICGi042-A не выявил контаминации микоплазмами на 19 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов (STR) линии ИПСК ICGi042-A на 16 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckp-rubo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦГ СО РАН FWNR-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технического развития Югры в соответствии с проектом исследования № 2022-05-03/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациенту была предоставлена вся информация о настоящем исследовании и им собственноручно подписано информированное согласие и информационный лист.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В. Григорьева, С.В. Павлова и А.А. Малахова внесли равный вклад в работу и выполняли всю культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, а именно, репрограммирование мононуклеарных клеток, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сэнгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Ю.М. Минина выполнила кариотипирование полученной линии ИПСК. Анализ данных экзомного секвенирования был выполнен Ю.В. Вяткиным. Медицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым. Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, А.А. Малахова, Л.В. Коваленко и С.М. Закиян разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // *Mol. Cell Probes*. 1998. V. 12. № 5. P. 301–308.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. 2020. V. 72. № 5. P. 649–663.
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(5). 4437. <https://doi.org/10.3390/ijms24054437>
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.

**Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi042-A,
by Reprogramming Peripheral Blood Mononuclear Cells from Parkinson's Disease
Patient with *c.1000G>A* Mutation in *LRRK2* Gene**

**E. V. Grigor'eva^{1, 2, 3, *}, S. V. Pavlova^{1, 2, 3}, A. A. Malakhova^{1, 2, 3}, S. P. Medvedev^{1, 2, 3}, J. M. Minina¹,
Y. V. Vyatkin⁴, E. A. Khabarova^{1, 5}, J. A. Rzaev⁵, L. V. Kovalenko⁶, and S. M. Zakian^{1, 2, 3}**

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. acad. Lavrentieva, 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Rechkunovskaya, 15, Novosibirsk, 630055 Russia*

³*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. acad. Lavrentieva, 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁴*Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁵*FSBI Federal Neurosurgical Center, ul. Nemirovicha-Danchenko, 132/1, Novosibirsk, 630087 Russia*

⁶*Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Ugra “Surgut State University”, prosp. Lenina, 1, Surgut, 628403 Russia
e-mail: evlena@bionet.nsc.ru

The search for new polymorphisms associated with hereditary diseases is important for diagnostics and the study of the disease development pathology. We have analyzed clinical exome of a Parkinson's disease patient and identified single-nucleotide variations in the *LRRK2* (*c.1000G>A*, *c.2167A>G*) and *PINK1* (*c.1562A>C*) genes. The *LRRK2:c.1000G>A* mutation has uncertain clinical significance, and is interesting for further investigation. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from PBMCs of the patient by a non-integrating episomal vectors. iPSCs demonstrate typical morphology and normal karyotype (46,XY), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60), and are able to produce derivatives of three germ layers.

Keywords: Parkinson's disease, induced pluripotent stem cells, polymorphisms, reprogramming