

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

ЛИНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi023-A, ПОЛУЧЕННАЯ ОТ ПАЦИЕНТА С ПОЛИМОРФИЗМАМИ В ГЕНАХ *LRRK2* И *PINK1*, АССОЦИИРОВАННЫМИ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

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

^cФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук, 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

^fБУВО Ханты-Мансийского автономного округа — Югры “Сургутский государственный университет”,
просп. Ленина, 1, Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ — Югра, 628403 Россия

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

Поступила в редакцию 21.09.2022 г.

После доработки 07.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Болезнь Паркинсона — это нейродегенеративное заболевание, лишь в 5% случаев имеющее известную генетическую обусловленность. Анализ клинического экзоза пациента со случаями паркинсонизма в семейном анамнезе выявил полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1*. Мононуклеарные клетки крови пациента репрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью эписомных векторов, экспрессирующих факторы плюрипотентности. Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) демонстрировала типичную морфологию плюрипотентных клеток человека, имела нормальный кариотип, экспрессировала OCT4, NANOG, SOX2 и TRA-1-60 и давала производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке *in vitro*. Полученная линия ИПСК является ценным инструментом для изучения вклада полиморфных вариантов генов *LRRK2* и *PINK1* в патогенез болезни Паркинсона.

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

DOI: 10.31857/S047514502301007X, **EDN:** FRKMTС

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Развитие патологии обусловлено гибелью нейронов черной субстанции головного мозга, продуцирующих нейромедиатор дофамин. Снижение уровня дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, таких как брадикинезия, ри-

гидность мышц и тремор. Большинство случаев заболевания возникает в возрасте 60–70 лет, однако в 10–15% случаев болезнь Паркинсона дебютирует в возрасте до 45 лет. Помимо идиопатической формы БП, которая, как правило, имеет позднее начало, существует наследственная форма БП, для которой известны случаи с ранним началом. На сегодняшний день известно более 25 генетических локусов, ассоциированных с БП, мутации в которых объясняют 3–5% случаев возникновения

[&] Равный вклад авторов.

заболевания (Bloem et al., 2021). Наиболее часто наследственные формы БП обусловлены патологическими вариантами генов *SNCA*, *GBA* и *LRRK2*, характеризующимися аутосомно-доминантным типом наследования, а также генов *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1* и *ATP13A2*, наследующимися по аутосомно-рецессивному типу. Таким образом, для БП характерна существенная генетическая гетерогенность. Как клиническая, так и генетическая гетерогенность приводят к большим трудностям при разработке новых средств диагностики и лечения БП. Создание клеточных моделей заболеваний человека имеет важное значение для изучения механизмов развития патологии и проведения фармакологических исследований. Получение культур нейронов среднего мозга пациентов путем биопсии невозможно. Решить проблему позволяет использование технологии индуцированной плюрипотентности. Дифференцированные производные пациент-специфичных ИПСК воспроизводят фенотипические особенности проявления болезни у конкретных пациентов и могут служить моделями для создания и тестирования новых лекарственных средств. В настоящей работе описано получение и детальная характеристика новой линии ИПСК ICGi023-A, полученной путем репрограммирования моноклеарных клеток крови пациента с БП, несущего генетические варианты *LRRK2:c.1653C>G*, *LRRK2:c.4193G>A*, *PINK1:c.1018G>A*, *PINK1:c.1562A>C*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

5×10^5 МНК трансфицированы набором эпизомных векторов (по 500 нг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (Addgene № 41855-58, 41813-14) с помощью Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific). Дальнейшее культивирование клеток проводили по протоколу получения фидер-независимых ИПСК, как описано в инструкции для пользователей Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) (https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fepi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf). Первичные колонии ИПСК отбирали микрокапилляром и помещали в лунки 4-ячеечных планшетов, обработанных матригелем (Matrigel matrix, Corning) в среду Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 100 ед./мл пенициллина-стрептомицина. Для пересева использовали 0.5 мМ ЭДТА в буфере PBS, клетки рассаживали в соотношении 1 : 10 каждые 4–5 дней, в ростовую среду при пересадке добавляли 2 мМ тиазовивина (STEMCELL Technologies). Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Выделение геномной ДНК и РНК

Геномную ДНК из клеток выделяли набором Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Секвенирование клинического экзоза

Для приготовления библиотек ДНК для экзомного секвенирования использовали набор NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs), двойное баркодирование проводили с помощью набора NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs). Для обогащения библиотеки использовали SureSelectXT Target Enrichment System (Agilent Technologies), секвенирование в режиме Rapid Run Mode. Сырые данные с Illumina HiSeq 2500 доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295, образец SAMN14446264, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/14446264>).

Секвенирование по Сэнгеру

Верификацию мутаций в геноме ИПСК проводили секвенированием по Сэнгеру. Целевой район гена амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в табл. 1. Продукт ПЦР очищали выделением из агарозного геля. Секвенирующие реакции ставили с использованием Big Dye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и праймеров, используемых для ПЦР. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на приборе ABI 3130xl Genetic Analyzer в ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Количественная ОТ-ПЦР

Для синтеза кДНК из 1 мкг РНК использовали ревертазу M-MuLV (Biolabmix). Реакции количественной ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix). Результаты нормализовали на beta-2-microglobulin используя метод ΔΔCT.

Кариотипирование

Кариотип клеток анализировали на 18 пассаже по протоколу, описанному ранее, используя DAPI-бэндинг (Grigor'eva et al., 2020).

Детекция микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмой и наличия последовательностей эписом в клетках проводили с помощью ПЦР, как описано ранее (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Таблица 1. Антитела и праймеры, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Mouse IgG1 anti-OCT3/4	1 : 200	BD Transduction Laboratories, 611202	RRID: AB_398736
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 500	Cell Signaling, 3579	RRID: AB_2195767
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 200	Abcam, ab62734	RRID: AB_956161
	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 Anti-HNF-4-alpha	1 : 100	Abcam, ab231167	RRID:AB_2895610
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11029	RRID: AB_2534088
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID: AB_144696
	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
	Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID: AB_2535766
	Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21131	RRID: AB_2535771

Таблица 1. Окончание

	Праймеры		
	Ген/ локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	<i>Beta-2-Microglobulin</i>	280 пн	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>NANOG</i>	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGGTTCACC
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
Маркер плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>SOX2</i>	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Верификация мутации	<i>LRRK2:c.1653C>G</i>	533 пн	AAGCACAGCCTACTCACAC/ CCTATCATAGCAAACGGAGAACAG
Верификация мутации	<i>LRRK2:c.4193G>A</i>	436 пн	ATCGGTTGCTGACAAATATGCT/ AAAGAGACTGAAGCAATTGTTTGCC
Верификация мутации	<i>PINK1:c.1018G>A</i>	426 пн	CGTATTGGGAGTCGTCGATGTG/ AAGGAACCTGGGAAGTGCTGTCTC
Верификация мутации	<i>PINK1:c.1562A>C</i>	466 пн	GAAGGGCATCAGTAGGAGATAGG/ CATTACAGACCATCACGACACAG

Спонтанная дифференцировка in vitro

Спонтанную дифференцировку ИПСК проводили с помощью формирования эмбрионидных телец в течение 14 дней, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020). Для исследования спектра дифференцированных производных эмбрионидные тельца рассаживали на 8-луночные планшеты для имиджинга Chambered Coverglass plates (Thermo Fisher Scientific), обработанные белками внеклеточного матрикса Matrigel (Corning), и культивировали 7–9 дней.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (10 мин при комнатной температуре), обрабатывали 0.5% Triton-X100 (30 мин, комн. *t*), затем 1%

BSA (30 мин, комн. *t*). С первичными антителами инкубировали при 4°C в течение ночи, отмывали PBS 2 раза по 15 мин, вторые антитела добавляли на 1.5–2 ч (комн. *t*). Список антител приведен в табл. 1. Ядра окрашивали DAPI. Препараты анализировали на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E, микрофотографии обрабатывали с использованием программного обеспечения NIS Elements.

STR анализ

Генотипирование образцов ДНК проводили методом фрагментного анализа по полиморфным маркерам, входящим в наборы AmpFISTR Identifier (Applied Biosystems) и InvestigatorHDplex (QIAGEN), на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi023-A

Параметр	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi023-A
Альтернативное название линии	PD45-6-1Lm
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, 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: 45 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2016 г.
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 генетических конструкций	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2:c.1653C>G</i> , rs7308720 <i>LRRK2:c.4193G>A</i> , rs7133914 <i>PINK1:c.1018G>A</i> , rs3738136 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тесте на формирование эмбрионидных телес 46,XY
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 (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	0.5 мМ ЭДТА
Кратность пересева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi023-A
Дата паспортизации/депонирования	14/04/2022

ms, Japan) компанией “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточной линии

Линия ИПСК ICGi023-A получена путем репрограммирования мононуклеарных клеток (МНК) пе-

риферической крови 45-летнего мужчины, в семейном анамнезе которого описаны случаи паркинсонизма. Паспорт клеточной линии приведен в табл. 2. Секвенирование клинического экзоса выявило полиморфные варианты генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона: *LRRK2:c.1653C>G*, *LRRK2:c.4193G>A*, *PINK1:c.1018G>A*, *PINK1:c.1562A>C*. Проведена трансфекция МНК

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGI023-A

Параметр	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Типичная для плюрипотентных клеток	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ <i>Окраска на щелочную фосфатазу</i>	Положительный	Рис. 1б
	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Выявляются маркеры плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2, TRA-1-60	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>Количественная ОТ-ПЦР</i>	Повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности <i>NANOG, OCT4, SOX2</i>	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 450–500	Рис. 1з
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с МНК	Доступны по запросу у авторов
Генотипирование	Секвенирование клинического экзоса	<i>LRRK2:c.1653C>G</i> , rs7308720 <i>LRRK2:c.4193G>A</i> , rs7133914 <i>PINK1:c.1018G>A</i> , rs3738136 <i>PINK1:c.1562A>C</i> , rs1043424	Данные загружены в базу данных SRA (SAMN14446264)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие мутаций в гетерозиготном состоянии	Рис. 1д
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1е
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбриоидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Выявлены маркеры трех зародышевых листков: αSMA и COL4 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); HNF4a и CK18 (энтодерма)	Рис. 1и
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

неинтегрирующимися эписомными векторами, кодирующими факторы плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ICGI023-A имела типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток и демонстрировала активность щелочной фосфатазы (рис. 1а, 1б). На 12 пассаже клетки экспрессировали транскрипционные факторы OCT4, NANOG и SOX2 и поверхностный маркер TRA-1-60 (рис. 1в), а также демонстрировали повышение уровня экспрессии *OCT4, NANOG, SOX2* по сравнению с исходными МНК (рис. 1г).

В качестве положительного контроля при оценке экспрессии использовали линию эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004). Элиминацию эписомных векторов проверяли с помощью ПЦР (рис. 1ж). Полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру (рис. 1д). Способность полученной линии ИПСК дифференцироваться в производные трех зародышевых листков продемонстрирована путем спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах. Иммунофлуоресцентное окрашивание

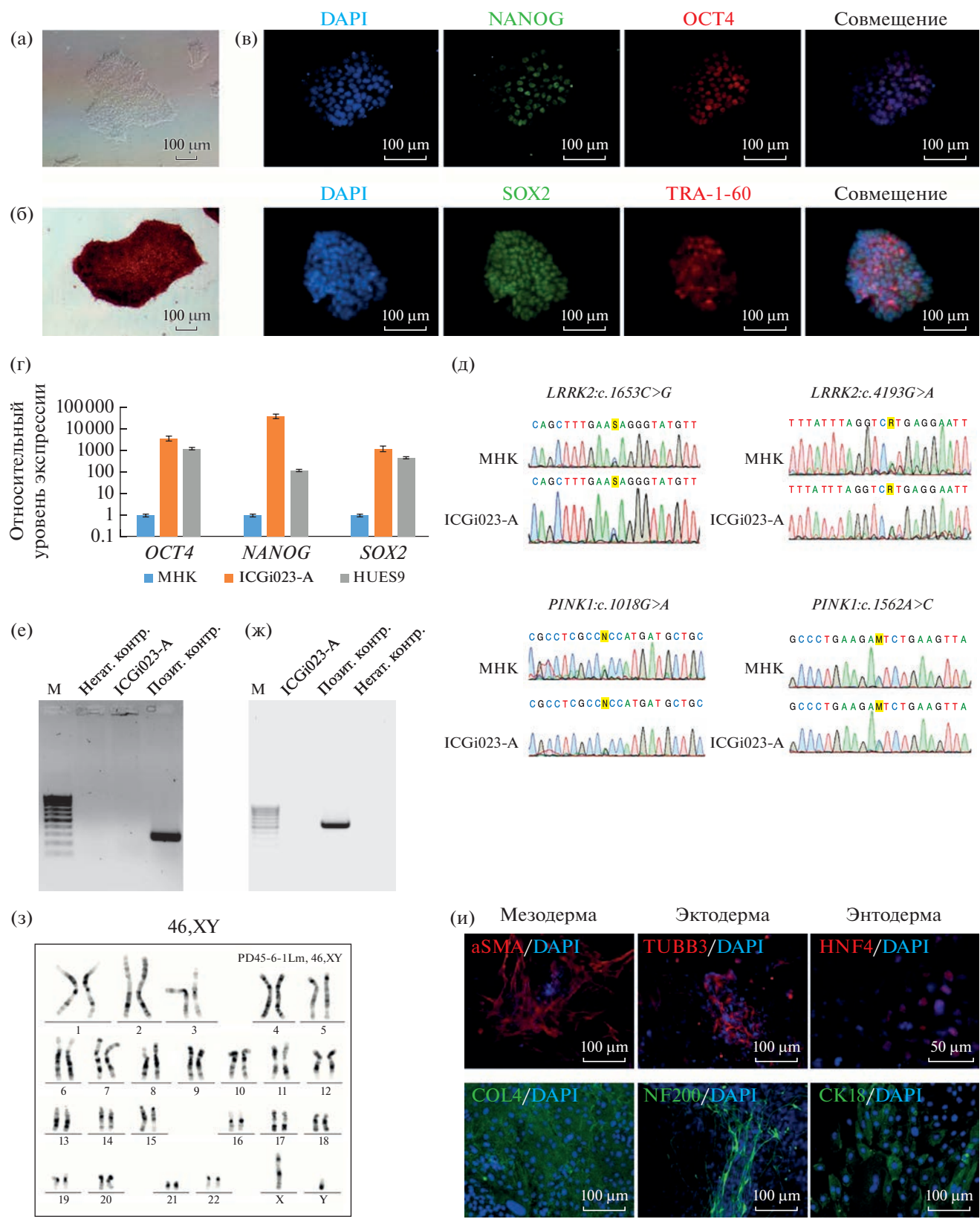


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК ICGi023-A. (а) Морфология клеток линии ICGi023-A; (б) демонстрация активности щелочной фосфатазы в клетках линии ICGi023-A; (в) экспрессия транскрипционных факторов OCT4, NANOG и SOX2, а также поверхностного маркера TRA-1-60 на 12 пассаже; (г) данные ПЦР в реальном времени, повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* по сравнению с исходными МНК; (д) полиморфизмы в генах *LRRK2* и *PINK1* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру; (е) ПЦР тест не выявил контаминации линии микоплазмами; (ж) ПЦР тест показал элиминацию эписомных векторов; (з) на 18-м пассаже клетки линии имели нормальный кариотип (46,XY); (и) подтверждение спонтанной дифференцировки клеток линии ICGi023-A в три зародышевых листка при формировании эмбрионидных тел; экспрессия маркеров производных эктодермы (нейрофиламент 200 (NF200) и тубулин $\beta 3$ (TUBB3)), мезодермы (гладкомышечный актин α (α SMA) и коллаген VI типа (COL4)) и энтодермы (транскрипционный фактор гепатоцитов HNF4a и кератин 18 (CK18)). Обозначения: МНК – мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 – линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки – 100 мкм.

выявило производные эктодермы (нейрофиламент 200 (NF200) и тубулин $\beta 3$ (TUBB3)), мезодермы (гладкомышечный актин α (α SMA) и коллаген VI типа (COL4)) и энтодермы (транскрипционный фактор гепатоцитов HNF4a и кератин 18 (CK18)) среди дифференцированных клеток (рис. 1и). Анализ STR показал идентичность линии ICGi023-A с исходными МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов). На 18 пассаже линия ИПСК имела нормальный кариотип 46,XY (рис. 1з). Линия свободна от контаминации микоплазмой (рис. 1е). Полная характеристика приведена в табл. 3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Визуализацию результатов иммунофлуоресцентного окрашивания клеток проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда научно-технического развития Югры в соответствии с проектом № 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. Пациентом было собственноручно подписано добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Малахова, С.В. Павлова и Е.В. Григорьева внесли равный вклад в работу, ими проведено репрограммирование мононуклеарных клеток крови, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная характеристика линии ICGi023-A. 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 крови осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым. А.А. Малахова, С.В. Павлова, Е.В. Григорьева, Л.В. Коваленко и С.М. Закиян разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bloem B.R., Okun M.S., Klein C. Parkinson's disease // *Lancet*. 2021. V. 397. № 10291. P. 2284–2303.
- 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.
- 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.

An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in *LRRK2* and *PINK1* Genes

A. A. Malakhova^{1, 2, 3, *}, S. V. Pavlova^{1, 2, 3}, E. V. Grigor'eva^{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*Surgut State University, prosp. Lenina, 1, Surgut, 628403 Russia*

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

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder with a range of causes, only 5% of which can be explained by known genetic variants. We revealed polymorphisms in *LRRK2* and *PINK1* genes of a person with parkinsonism cases in family anamnesis. PBMCs of the patient were reprogrammed with a non-integrating episomal vectors to generate an induced pluripotent stem cell (iPSC) line. The iPSC line showed typical morphology and normal karyotype, expressed pluripotency markers, and was capable to differentiate into three germ layers. The iPSCs represent a valuable tool for investigating a potential implication of the genetic variants into the Parkinson's disease pathogenesis.

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