

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi044-B И ICGi044-C С ПОМОЩЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЕЙ *c.1492T>G* В ГЕНЕ *GLUD2*

© 2023 г. Д. А. Сорогина^{a, b}, Е. В. Григорьева^{a, *}, А. А. Малахова^a, С. В. Павлова^a,
С. П. Медведев^a, Ю. В. Вяткин^b, Е. А. Хабарова^{a, c}, Дж. А. Рзаев^c, С. М. Закиян^a

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

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

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

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

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 25.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Болезнь Паркинсона — мультифакториальное заболевание, в его этиологию вносят вклад как генетическая предрасположенность (5% всех случаев), так и факторы окружающей среды, и возрастные изменения в головном мозге и других системах организма. Для диагностики и изучения патологии развития болезни важен поиск новых полиморфизмов, ассоциированных с наследственными формами заболевания. Мы проанализировали клинический экзом 55-летнего пациента с болезнью Паркинсона и выявили полиморфизм в гене *GLUD2* (*c.1492T>G*). Данный полиморфизм является патогенным по базе данных ClinVar, однако механизм патогенеза до сих пор остается мало изученным. Кроме того, в настоящее время нет релевантных моделей на основе клеток человека, что вызывает большой интерес. Мы создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с помощью неинтегрирующих эписомных векторов (OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA). Полученные линии ИПСК (ICGi044-B и ICGi044-C) демонстрируют типичную ЭСК-подобную морфологию, нормальный кариотип (46,XY), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) и способны давать производные трех зародышевых листков. Линии ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C, а также их нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения патогенетических механизмов развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутацией *c.1492T>G* в гене *GLUD2*.

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

DOI: 10.31857/S0475145023010123, **EDN:** FRVDZS

ВВЕДЕНИЕ

Пациент-специфичные клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) позволяют изучать механизмы развития различных наследственных заболеваний без хирургического вмешательства в организм человека. Это особенно полезно для изучения нейроде-

генеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона.

Наследственная форма болезни Паркинсона может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *GLUD2*. Этот ген расположен на X-хромосоме и не имеет интронов. *GLUD2* кодирует митохондриальный фермент глутаматдегидрогеназу 2, который участвует в окис-

лении глутамата до α -кетоглутарата. *GLUD2* экспрессируется только в клетках Сертоли, астроцитах и нейронах.

Мутация *c.1492T>G* в гене *GLUD2* приводит к замене Ser445Ala в ферменте, что является причиной усиления ее активности. Из-за повышенной степени ферментативной активности происходит нарушение работы дофаминергических нейронов, что ведет к развитию болезни Паркинсона. У мужчин, гемизиготных по этой мутации, наблюдается раннее начало заболевания.

Полученные в данном исследовании линии ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C, а также их нейральные производные представляют собой уникальную клеточную модель *in vitro* для изучения патогенетических механизмов развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутацией *c.1492T>G* в гене *GLUD2*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

1×10^6 моноклеарных клеток (МНК) периферической крови трансфицировали набором эписомных 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), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза и культивировали, как описано (Grigor'eva et al., 2023). Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали на чашки с митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши в среду, содержащую 85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Для пассирования ИПСК диссоциировали с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific) и рассаживали в соотношении 1 : 8–1 : 10 с 2 мкМ тиазовивином (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 образца ДНК из пациент-специфичных МНК проводили в компании “Генотек” (<https://www.genotek.ru>). Библиотечка была создана с использованием 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 SAMN22788975, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bio-sample/22788975>).

Подтверждение наличия мутации *GLUD2 c.1492 T>G* в ИПСК проводили секвенированием по Сэнгеру, праймеры 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 – 30 с; 65°C – 30 с; 72°C – 15 с; и 72°C – 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) (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Праймеры перечислены в табл. 1.

Анализ кариотипа

Для кариотипирования клетки рассаживали на 4 лунки 12-луночного планшета с расчетом, чтобы через 2 сут монослой клеток достигал 80–90% конфлюэнтности. За 2.5 ч до фиксации среду меняли на свежую с добавлением 25–50 нг/мл колленида. Клетки дезагрегировали 200 мкл TrypLE, к суспензии доливали 3 мл 0.28% KCl и инкубировали 20 мин при 37°C, затем к суспензии осторожно добавляли 1–2 капли фиксатора Карнуа (метанол–уксусная кислота 3 : 1). Клетки аккуратно суспендировали и переносили в центрифужную пробирку. Центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин (300 g), супернатант сливали, к осадку осторожно добавляли 1 мл охлажденного во льду фиксатора, не перемешивая оставляли пробирку на 20 мин на льду. Затем клетки аккуратно пипетировали и центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин (300 g). Осадок ресуспендировали в свежем охлажденном фиксато-

Таблица 1. Антитела и праймеры, 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-NANOG	1 : 500	Abcam, ab62734	RRID:AB_956161
	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- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Rabbit IgG anti-NKX2.5 (H-114)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-14033	RRID:AB_650281
	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-HNF3b (FOXA2)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, sc-374, 376	RRID:AB_10989742
	Mouse IgG2a anti-AFP	1 : 250	Sigma, A8452	RRID:AB_258392
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/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGGTTCACC
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAATC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAACTC
Подтверждение мутации	<i>GLUD2: с.1492 T>G</i>	218 пн	CTAACTACCACTTGCTCCTGTC/ CAGGTCCAATCCCAGGTTATAC

ре и переносили в 1.5 мл пробирки для хранения и транспортировки. Суспензии фиксированных клеток передавали в клинично-диагностическую лабораторию генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ для анализа кариотипа.

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-X100 (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 сделаны с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию 1 мкг РНК проводили с помощью обратной транскриптазы М-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с 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 КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Паспорт клеточных линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C представлен в табл. 2, полная характеристика этих линий представлена на рис. 1 и в табл. 3.

Таблица 2. Паспорт клеточных линий ICGi044-B и ICGi044-C

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi044-B ICGi044-C
Альтернативное название линии	PD40-8 PD40-13
Учреждение	ФГБНУ 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: 55 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2017 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 репрограмирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>GLUD2 c.1492 T>G</i> , rs9697983
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микопlasma не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши
Среда культивирования	85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	Энзиматический, TrypLE (Thermo Fisher Scientific)
Кратность пересева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi044-B https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi044-C
Дата паспортизации/депонирования	07/11/2022

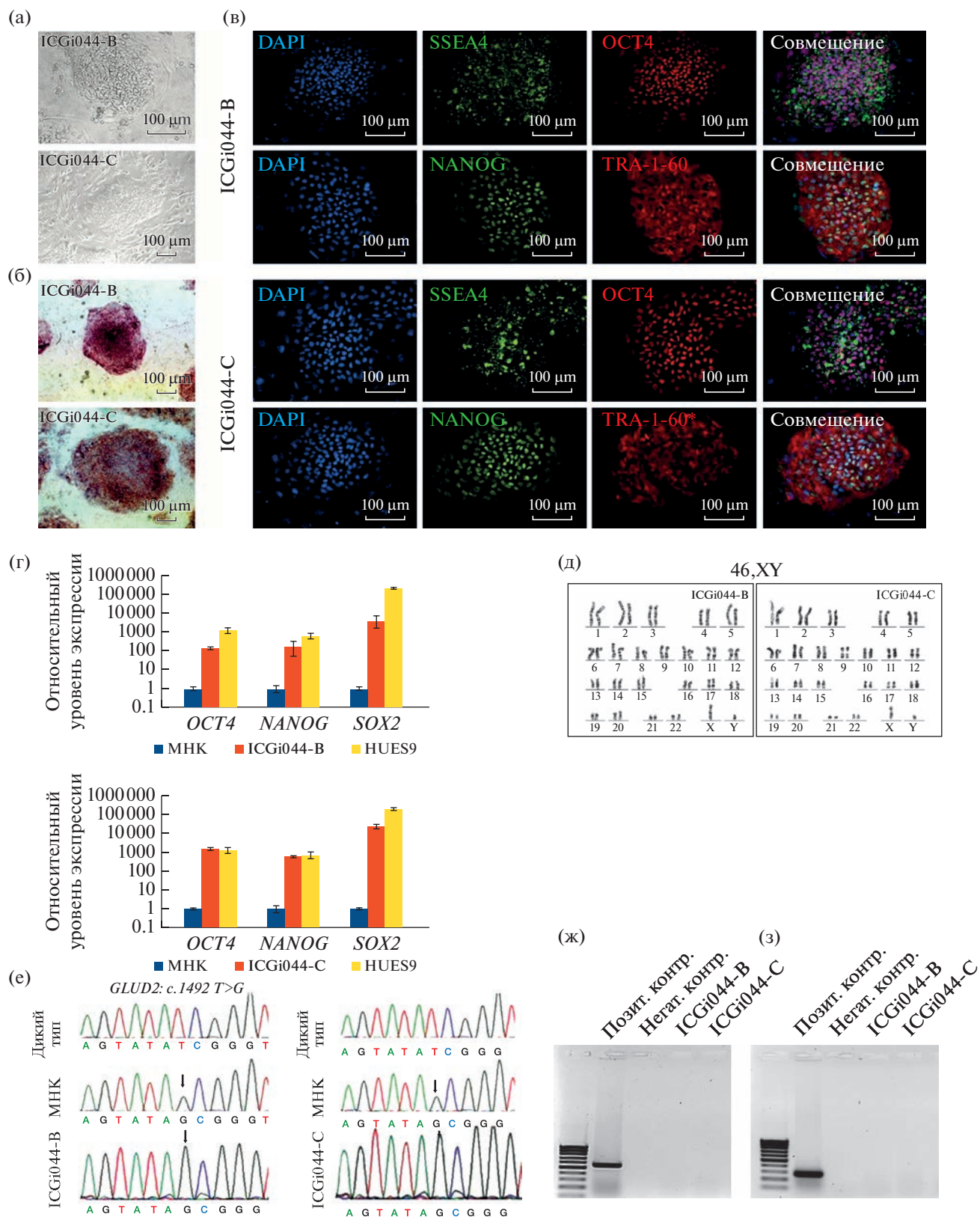


Рис. 1. Начало.

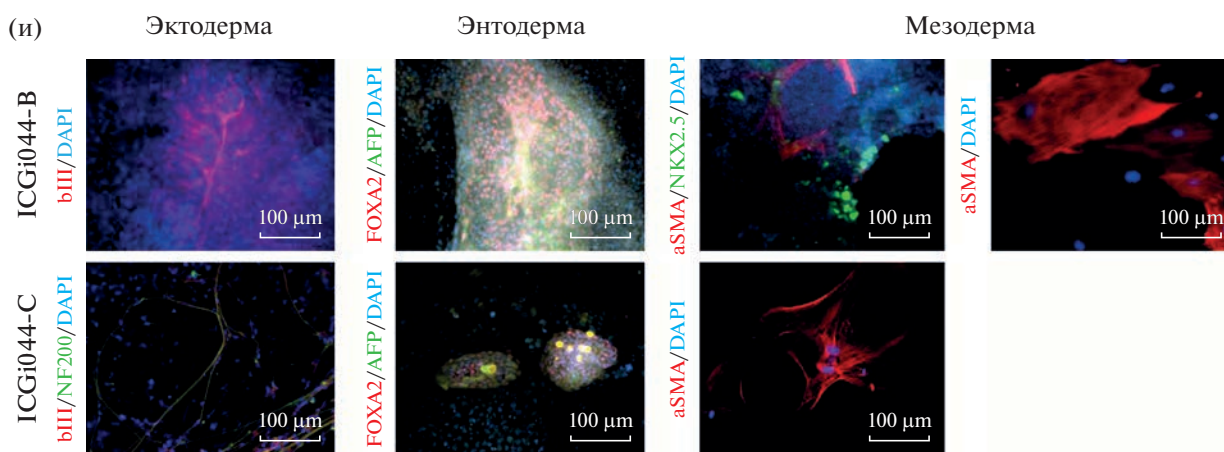


Рис. 1. Характеристика линий ИПСК человека ICGi044-B и ICGi044-C. (а, б) Колонии клеток ICGi044-B и ICGi044-C, растущие на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: *OCT4* (красный), *NANOG* (зеленый), *SSEA4* (зеленый), *TRA-1-60* (красный) на 18 пассаже; (г) количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* на 20-м пассаже; (д) G-бэндинг линии ICGi044-B на 28 пассаже и линии ICGi044-C на 27 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY); (е) секвеннограммы участков гена *GLUD2* МНК пациента с БП, линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C и здорового донора (дикий тип); (ж) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (тубулина $\beta 3$ (*TUBB3/TUJ1*), нейрофиламента 200 (*NF200*)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), гомеобоксный белок *NKX2.5*), энтодермы (ядерный фактор гепатоцитов (*FOXA2*), α -фетопротеин (*AFP*)); (з, и) результаты ПЦР тестов; (з) эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 20-м пассаже; (и) контаминация линий микоплазмами на 20-м пассаже не выявлена. Обозначения: МНК — мононуклеарные клетки периферической крови, HUES9 — линия эмбриональных стволовых клеток человека, служившая положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. Все масштабные линейки — 100 мкм.

При анализе клинического экзомного секвенирования образца ДНК 55-летнего мужчины с болезнью Паркинсона, был выявлен патогенный генетический вариант *c.1492 T>G* гена *GLUD2* (ClinVar: VCV000029936.3), ассоциированный с болезнью Паркинсона. Данный полиморфизм приводит к замене в аминокислотной последовательности (p.S445A) митохондриального фермента глутаматдегидрогеназы 2 и повышает ее активность. Мы трансфицировали МНК периферической крови пациента неинтегрирующими эписомными плазмидными векторами, экспрессирующими факторы плюрипотентности, приводящие к репрограммированию соматических клеток: *OCT4*, *KLF4*, *L-MYC*, *SOX2*, *LIN28* и *p53 shRNA* (Okita et al., 2013). Полученные линии ИПСК (ICGi044-B и ICGi044-C) были подробно охарактеризованы. Колонии клеток росли на пластике, покрытом эмбриональными фибробластами мыши, обработанными митомицином С (Sigma), демонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), были положительными по активности щелочной фосфатазы (рис. 1б) и интенсивно пролиферировали. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции *NANOG* 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 ICGi044-B на 28 пассаже и линии ICGi044-C на 27 пассаже показал нормальный кариотип (46,XY) (рис. 1д). Полиморфизм *c.1492 T>G* в гене *GLUD2* был подтвержден секвенированием по Сэнгеру в линиях ICGi044-B и ICGi044-C и сопоставлен с полиморфизмами в ДНК МНК (рис. 1е). Способность полученных клеточных линий дифференцироваться в три зародышевых листка была подтверждена спонтанной дифференцировкой *in vitro* посредством образования эмбрионидных телец. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина $\beta 3$ (*TUBB3/TUJ1*), нейрофиламента 200 (*NF200*)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), гомеобоксный белок *NKX2.5*), энтодермы (ядерный фактор гепатоцитов (*FOXA2*), α -фетопротеин (*AFP*)) (рис. 1ж). Эписомные векторы элиминировались в ИПСК на 20 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C не выявил контаминации микоплазмами на 20 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов

Таблица 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi044-B и ICGi044-C

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, SSEA4, 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 экзона	<i>GLUD2: с. 1492 T>G, rs9697983</i>	Данные секвенирования загружены в базу данных SRA (SAMN22788975)
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие мутаций в гемизиготном состоянии	Рис. 1е
Контаминация	Микопlasма	Отсутствует	Рис. 1и
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и NKX2.5 (мезодерма); NF200 и TUBB3/TUJ1 (эктодерма); FOXA2 и AFP (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

(STR) линий ИПСК ICGi044-B и ICGi044-C на 17 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

Клиническое экзомное секвенирование было выполнено в Новосибирском национальном исследовательском государственном университете.

БЛАГОДАРНОСТИ

Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckrtabo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNr-2022-0015. МНК были предоставлены ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 19-75-20063.

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, А.А. Малахова и С.М. Закиан разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи. Д.А. Сорогина и Е.В. Григорьева репрограммировали моноклеарные клетки пациента. Вся культуральная и молекулярно-генетическая работа была проведена Д.А. Сорогиной, а именно получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сенгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Анализ данных экзомного секвенирования был выполнен Ю.В. Вяткиным. Медицинское сопровождение пациента и предоставление моноклеарных клеток было осуществлено Е.А. Хабаровой и Дж.А. Рзаевым.

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. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0186>
- 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr040330>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00406-7>
- 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. V. 24(5). P. 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 // *Stem Cells*. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.

Creation of Induced Pluripotent Stem Cells ICGi044-B and ICGi044-C Using Reprogramming of Peripheral Blood Mononuclear Cells of a Patient with Parkinson's Disease Associated with *c.1492T>G* Mutation in the *GLUD2* Gene

D. A. Sorogina^{1,2}, E. V. Grigor'eva^{1,*}, A. A. Malakhova¹, S. V. Pavlova¹, S. P. Medvedev¹, Y. V. Vyatkin², E. A. Khabarova^{1,3}, J. A. Rzaev³, and S. M. Zakian¹

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

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

³*FSBI Federal Neurosurgical Center, ul. Nemirovicha-Danchenko, 132/1, Novosibirsk, 630087 Russia*

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

Parkinson's disease is a multifactorial disease; both genetic predisposition (5% of all cases), environmental factors and age-related changes in the brain and other body systems contribute to its etiology. For the diagnosis and study of the pathology of the development of the disease, it is important to search for new polymorphisms associated with hereditary forms of the disease. We analyzed the clinical exome of a 55-year-old patient with Parkinson's disease and identified a single nucleotide polymorphism in the *GLUD2* gene (*c.1492T>G*). This genetic variant is pathogenic according to the ClinVar database, but the mechanism of pathogenesis is still poorly understood. In addition, there are currently no relevant models based on human cells, which is of great interest. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patient peripheral blood mononuclear cells using non-integrating episomal vectors expressing OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28, and p53 shRNA. The obtained iPSC lines (ICGi044-B and ICGi044-C) demonstrate typical ESC-like morphology, normal karyotype (46,XY), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) and are able to give derivatives of three germ layers. The iPSC lines ICGi044-B and ICGi044-C, as well as their neural derivatives, represent an unique in vitro cell model for studying the pathogenetic mechanisms of the development of Parkinson's disease associated with the *c.1492T>G* mutation in the *GLUD2* gene.

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