

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК iCGi043-A С ПОМОЩЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С ПАТОЛОГИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ p.G2019S *LRRK2*

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, & *}, С. В. Павлова^{a, &}, А. А. Малахова^{a, &}, Е. С. Яркова^a,
Д. А. Сорогина^a, Ю. М. Минина^a, И. В. Милухина^b, М. А. Николаев^c, С. Н. Пчелина^c,
С. П. Медведев^a, С. М. Закиян^a

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

^bФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук,
улица акад. Павлова, 9, Санкт-Петербург, 197376 Россия

^cПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022 Россия

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

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Патологический вариант p.G2019S в гене *LRRK2* приводит к возникновению наследственной формы болезни Паркинсона (БП) и встречается у 7% пациентов с семейной формой данной патологии, однако пока до конца не ясны механизмы, запускающие нейродегенеративные процессы. Из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с наследственной формой БП, ассоциированной с генетическим вариантом c.6055G>A (p.G2019S, rs34637584) в гене *LRRK2* нами были получены ИПСК (линия iCGi043-A) с использованием трансфекции эписомными векторами. Данные ИПСК интенсивно пролиферируют плотными однослойными колониями клеток, являются позитивными на эндогенную щелочную фосфатазу, имеют нормальный кариотип (46,XX), экспрессируют маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) и способны дифференцироваться в три зародышевых листка (экто-, энто- и мезодерму), что подтверждает их плюрипотентный статус. Дальнейшая направленная дифференцировка полученных ИПСК в дофаминергические нейроны позволит создать *in vitro* клеточную модель БП, ассоциированную с патологическим вариантом c.6055G>A в гене *LRRK2* и внести вклад в понимание патогенеза БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ген *LRRK2*, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023010056, EDN: FQQEYU

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения структуры гена обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*) являются наиболее частыми причинами развития наследственных форм болезни Паркинсона (БП). В то же время, точные механизмы участия варианта *LRRK2* в патогенезе БП пока не выяснены. Вариант

p.G2019S, усиливающий киназную активность фермента, встречается у 7% пациентов с семейной формой БП (Пчелина и др., 2011). Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию является революционной технологией и позволяет получать пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способные неограниченно поддерживаться в культуре и дифференцироваться в любой тип кле-

[&] Равный вклад авторов.

ток. Данная уникальная возможность позволяет создавать *in vitro* клеточные модели, используемые для поиска триггеров заболевания и тестирования новых лекарственных препаратов. От пациента с БП, ассоциированной с патогенным вариантом *c.6055G>A* (p.G2019S, rs34637584) в гене *LRRK2* нами были получены ИПСК, отвечающие всем требованиям плюрипотентных клеток. Клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности (факторы транскрипции SOX2, OCT4 и NANOG, а также поверхностные антигены TRA-1-60 и SSEA-4), имеют нормальный кариотип (46,XX), способны дифференцироваться во все три типа клеток эмбриона (экто-, энто- и мезодерму). Создание клеточной модели данной формы заболевания на основе ИПСК внесет вклад в изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе *LRRK2*-зависимого патогенеза БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

1×10^6 МНК трансфицировали набором эпизомных векторов, кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и mp53DD (по 0.5 мкг каждого) (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 в инструкции к набору Epi5TM 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). На 9 день после трансфекции клетки переводили на среду, содержащую 85% KnockOut DMEM, 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 мМ NEAA, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Первичные колонии ИПСК отбирали вручную и высевали в индивидуальные лунки 48-ячеечного планшета с предварительно посаженными митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши. ИПСК пассировали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 10 с добавлением ROCK ингибитора – 2 мкг/мл Thiazovivin (Sigma). Диссоциацию колоний ИПСК осуществляли реагентом TrypLE (Thermo Fisher Scientific). 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

Пациент с патогенным вариантом G2019S в гене *LRRK2* был выявлен в результате скрининга данной замены в группе пациентов с БП с использованием ПЦР-рестрикционного анализа (Pchelina et al., 2006). Наличие варианта *c.6055G>A* в гене *LRRK2* подтверждали 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 в течение 30 с; 68°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) (Chopra 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 телец, 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 ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ПЦР проводили на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с

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-human CD90	1 : 100	eBioscience, 14090982	RRID:AB_763535
	Rabbit IgG anti-GFAP	1 : 500	Dako Cat # Z0334	RRID:AB_10013382
	Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: TUJ1	1 : 1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Mouse IgG3 anti-SOX17	1 : 600	R&D systems Cat # MAB1924	RRID:AB_2195646
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 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
	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/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTTACC	
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA	
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC	
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	
Подтверждение генетического варианта	<i>LRRK2:c.6055G>A</i>	518 пн	GGCAGATACCTCCACTCAGC/ TTGATTTGCCTCACAAGTGC	

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi042-A

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi043-A
Альтернативное название линии	LR-21
Учреждение	ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики СО РАН”, Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук, протокол № 1 от 26.11.2020
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 74 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2020 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.6055G>A</i> (p.G2019S, rs34637584)
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель БП
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов 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 посева	Энзиматический, TripLE (Thermo Fisher Scientific)
Кратность посева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi043-A
Дата паспортизации/депонирования	05/12/2022

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-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,XX Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	25 из 25 полиморфных локусов совпадают с МНК	Данные доступны по запросу у авторов
Генотипирование	ПЦР-рестрикционный анализ	<i>LRRK2:c.6055G>A</i> , rs34637584	Данные доступны по запросу у авторов
	Секвенирование по Сэнгеру	Подтверждено присутствие генетического варианта в гетерозиготном состоянии	Рис. 1ж
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1з
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбриоидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: αSMA и CD90 (мезодерма); GFAP и TUBB3 (эктодерма); SOX17 и KRT18 (энтодерма)	Рис. 1е
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

набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Bio-labmix) 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 ICGi043-A представлен в табл. 2, полная характеристика этой линии приведена на рис. 1 и в табл. 3.

Генотипирование 74-летней пациентки с БП выявил патологический вариант *LRRK2:c.6055G>A* (p.G2019S). Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови пациентки были репрограммированы к плюрипотентному состоянию с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов, экспрессирующих факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ИПСК (ICGi043-A)

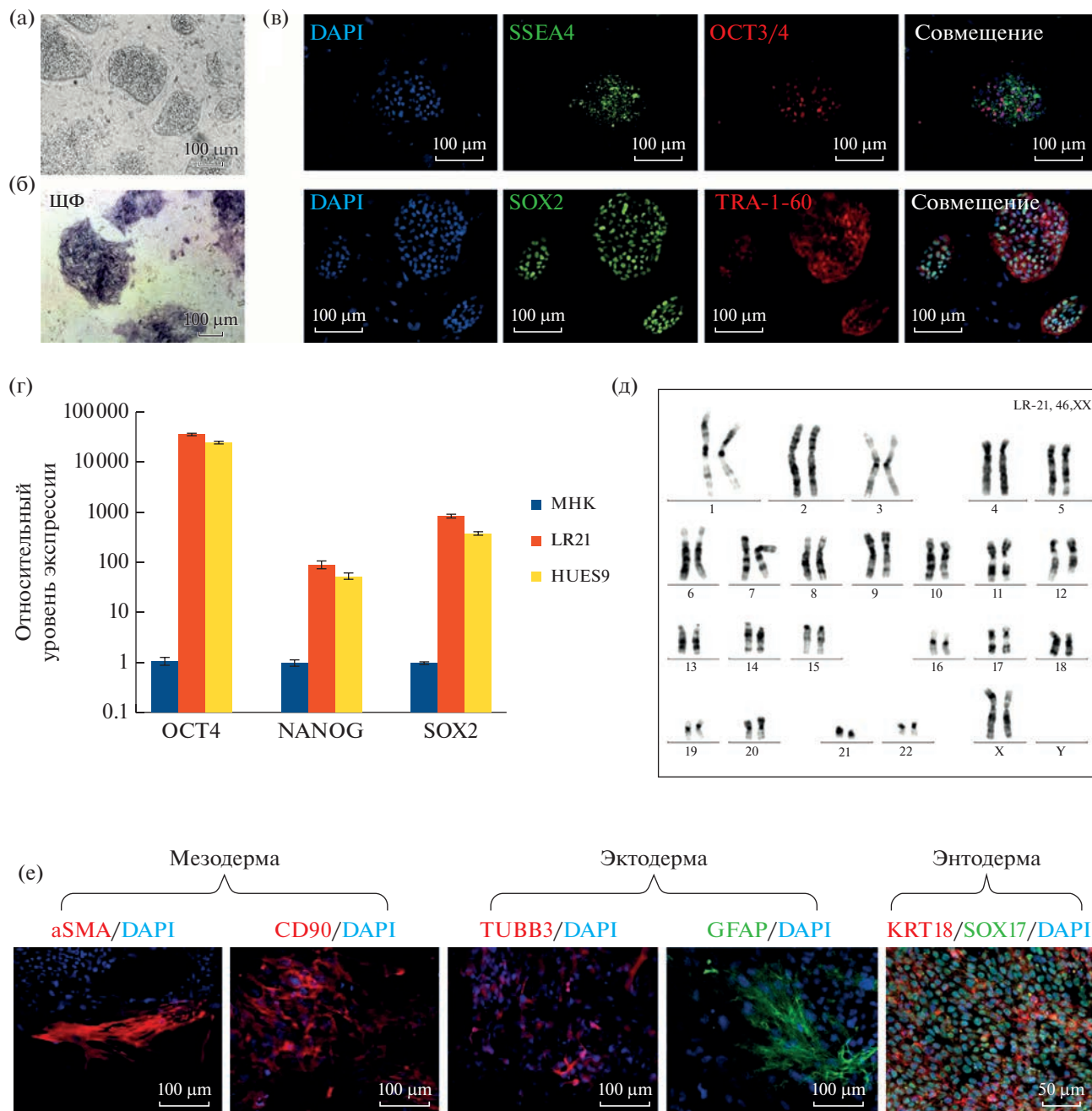


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-A. (а, б) Клетки линии ICGi043-A, растущие на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA4 (зеленый), TRA-1-60 (красный) на 16-м пассаже; (г) ПЦР в реальном времени маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) линии ИПСК ICGi043-A на 16-м пассаже, МНК пациента и линии ЭС клеток HUES9; (д) G-бэндинг линии ICGi043-A на 5 пассаже показал нормальный кариотип (46,XX); (е) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (тубулин $\beta 3$ (TUBB3/TUJ1), глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), поверхностный маркер CD90), энтодермы (SOX17, кератин 18 (KRT18)); (ж) секвенограммы участков гена *LRRK2* МНК пациента с БП, линии ИПСК ICGi043-A и здорового донора (дикий тип); (з, и) результаты ПЦР анализа; (з) эписомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже; (и) на 17 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, ЩФ – щелочная фосфатаза. Все масштабные линейки – 100 мкм.

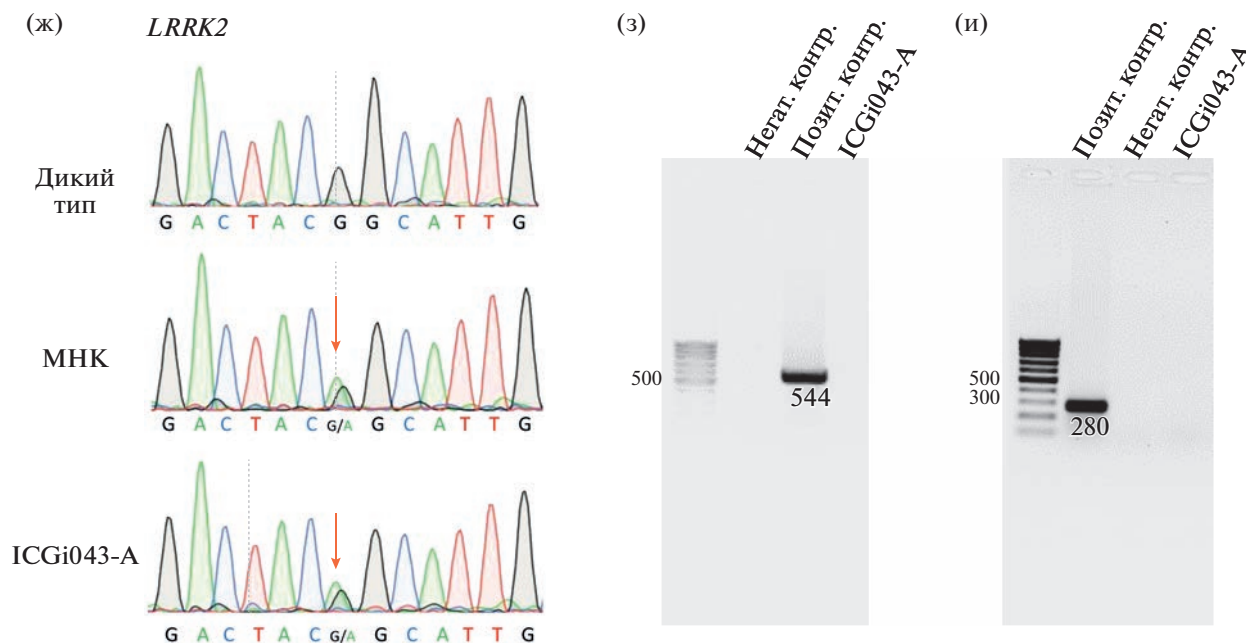


Рис. 1. Окончание.

была подробно охарактеризована. Колонии клеток росли на питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши, демонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1а), интенсивно пролиферировали и демонстрировали активность щелочной фосфатазы (рис. 1б). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток показало экспрессию факторов транскрипции SOX2 и OCT4, поверхностных антигенов TRA-1-60 и SSEA-4 на 16 пассаже (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени выявил повышение уровня экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4, NANOG и SOX2 на 16 пассаже (рис. 1г). Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (HVRDe009-A) служила положительным контролем экспрессии маркеров плюрипотентности. G-бэндинг линии ICGi043-A на 5 пассаже показал нормальный карิโอтип (46,XX) (было проанализировано 100 метафазных пластинок; рис. 1д). Наличие полиморфизма в гене *LRRK2* в линии ICGi043-A был подтвержден секвенированием по Сэнгеру и сопоставлен с полиморфизмом в ДНК МНК (рис. 1ж). Способность полученной клеточной линии ICGi043-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), глиальный фибриллярный кис-

лый белок (GFAP)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), поверхностный маркер CD90), энтодермы (SOX17, кератин 18 (KRT18)) (рис. 1е). Эпизомные векторы элиминировали в ИПСК на 15 пассаже (рис. 1з). ПЦР-тест линии ИПСК ICGi043-A не выявил контаминации микоплазмами на 17 пассаже (рис. 1и). Анализ коротких tandemных повторов (STR) линии ИПСК ICGi043-A на 10 пассаже продемонстрировал идентичность МНК по 25 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Репрограммирование мононуклеарных клеток периферической крови и характеристика ИПСК были выполнены в ФГБНУ Федеральный исследовательский центр "Институт цитологии и генетики СО РАН". Биологический материал (периферическая кровь) пациентки с патологическим вариантом *LRRK2*:c.6055G>A (p.G2019S) был предоставлен ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН. Выделение мононуклеарных клеток и генотипирование было осуществлено в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И.П. Павлова. Иммунофлуоресцентную визуализацию проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmao/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук, протокол № 1 от 26.11.2020. 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 культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, а именно, репрограммирование мононуклеарных клеток, получение индивидуальных клонов ИПСК и детальная их характеристика. Ведение индивидуальных клонов ИПСК и кПЦР были выполнены Е.С. Ярковой и Д.А. Сорогиной. С.П. Медведев выполнил секвенирование по Сенгеру для подтверждения наличия полиморфизмов в полученных ИПСК. Ю.М. Минина выполнила кариотипирование полученной линии ИПСК. Ме-

дицинское сопровождение пациента и предоставление мононуклеарных клеток осуществлено И.В. Милухиной. М.А. Николаев и С.Н. Пчелина провели скрининг пациентов с БП с вариантом G2019S в гене *LRRK2*. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. Клиническое течение *LRRK2*-ассоциированной болезни Паркинсона // Журн. неврологии и психиатрии. 2011. Т. 12. С. 56–62.
- 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.
- 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.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Ivanova O.N., Emelianov A.K., Zakharchuk A.H., Schwarzman A.L. G2019S *LRRK2* mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // Mov. Disord. 2006. V. 21. № 12. P. 2234–2236.

Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line, ICGi043-A, by Reprogramming Peripheral Blood Mononuclear Cells from Parkinson's Disease Patient with p.G2019S Mutation in *LRRK2* Gene

E. V. Grigor'eva^{1,*}, S. V. Pavlova¹, A. A. Malakhova¹, E. S. Yarkova¹, D. A. Sorogina¹, J. M. Minina¹, I. V. Miliukhina², M. A. Nikolaev³, S. N. Pchelina³, S. P. Medvedev¹, and S. M. Zakian¹

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

²Behtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, ul. Akademika Pavlova, 9, Saint Petersburg, 197376 Russia

³Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo, 6–8, Saint Petersburg, 197022 Russia

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

The pathological variant p.G2019S in the *LRRK2* gene leads to the occurrence of a hereditary form of Parkinson's disease (PD) and affects 7% of patients with a familial form of the disease. However, the mechanisms that trigger pathological events during the development of the disease are not yet fully understood. We obtained iPSCs (ICGi043-A line) from peripheral blood mononuclear cells of a patient with a hereditary form of PD associated with the genetic variant c.6055G>A (p.G2019S, rs34637584) in the *LRRK2* gene using transfection with episomal vectors. iPSCs rapidly proliferate in dense monolayer cell colonies, are positive for endogenous alkaline phosphatase, have a normal karyotype (46,XX), express pluripotency markers (OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) and are able to differentiate into three germ layers (ecto-, endo- and mesoderm), which confirms their pluripotent status. Future directed differentiation of the obtained iPSCs into dopaminergic neurons will allow the creation of an in vitro cell model of PD associated with the pathological variant c.6055G>A in the *LRRK2* gene, and contribute to understanding the pathogenesis of PD.

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