

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК iCGi043-А
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. Милюхина^b, М. А. Nikolaev^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: evlena@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-А) с использованием трансфекции эпизомными 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, ассоцииированную 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:** FQQEBY

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 × 10⁶ 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 Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) ([https://www.thermofisher.com/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Feipi5_episodes_ipsc_reprogramming_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Feipi5_episodes_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-ячеичного 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* подтверждало 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) (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 телец, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (10 мин, при комнатной температуре (КТ)), пермеабилизировали 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 дифферен- цированных 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 плюрипо- тентности (колич. ОТ-ПЦР)	NANOG	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCAACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCA	
	OCT4	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA	
	SOX2	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAAC	
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	
Подтверждение генетического варианта	<i>LRRK2:c.6055G>A</i>	518 пн	GGCAGATACCTCCACTCAGC/ TTGATTGCTCACAAAGTGC	

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека ICGi042-А

Параметры	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi043-А
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 эпизомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолчания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Ген/локус	<i>LRRK2:c.6055G>A</i> (р.G2019S, rs34637584)
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных телец
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 мМ NEAA, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1% пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °С	37
Концентрация СО ₂ , %	5
Концентрация О ₂ , %	20
Способ пересева	Энзиматический, TripLE (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/ICGi043-A
Дата паспортизации/депонирования	05/12/2022

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-А

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, rs34637584</i>	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 телец, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: aSMA 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ -метода.

STR анализ

Аутентификацию линии ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с использованием наборов AmpFlSTR 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-А 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 эпизомных векторов, экспрессирующих факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA (Okita et al., 2013). Полученная линия ИПСК (ICGi043-А)

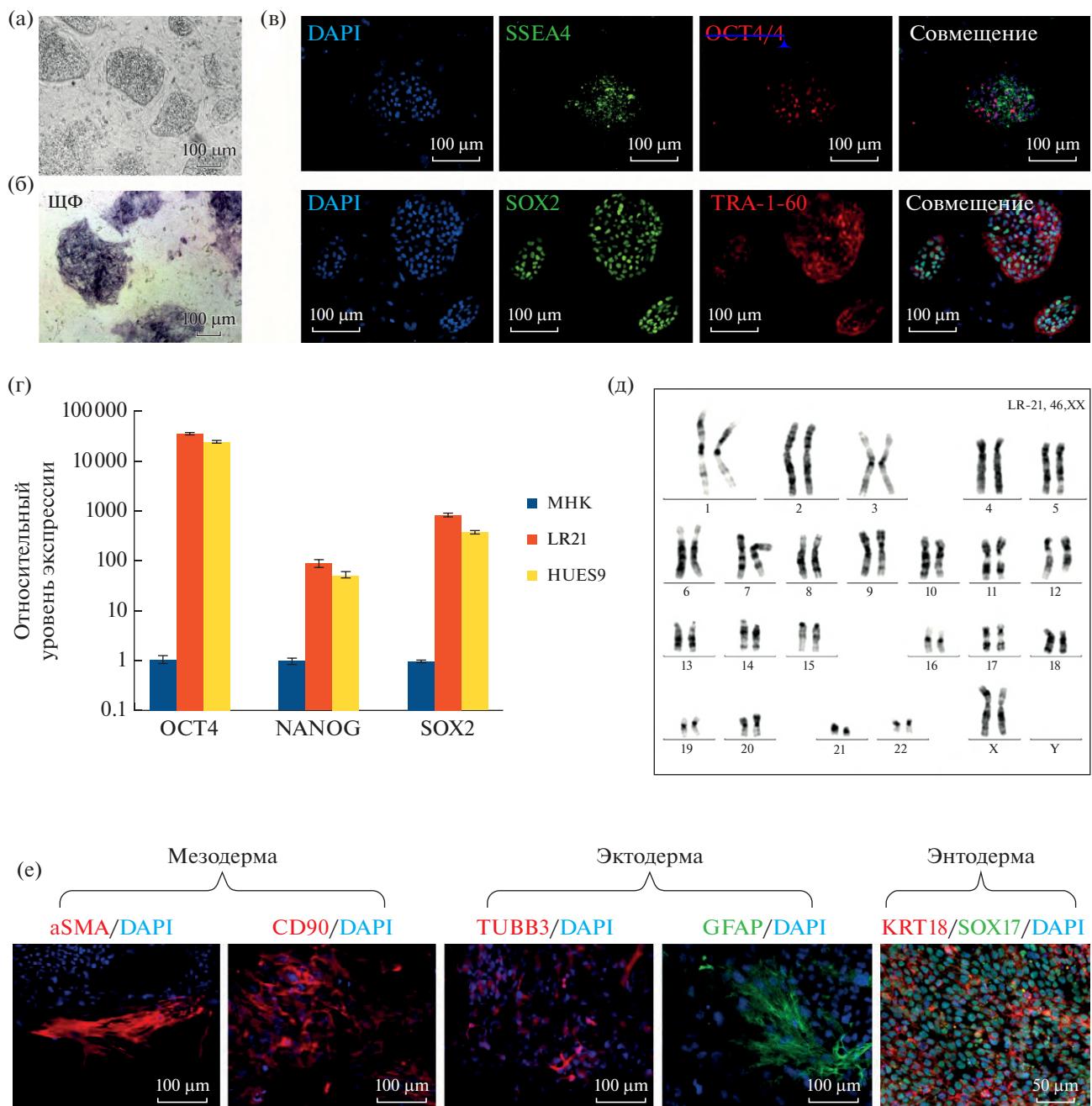


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека ICGi043-A. (а, б) Клетки линии ICGi043-A, растущие на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши; (а) морфология клеток; (б) гистохимическое выявление щелочной фосфатазы; (в) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры плюрипотентности: OCT4 (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) Г-бэндинг линии ICGi043-A на 5 пассаже показал нормальный кариотип (46,XX); (е) иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), глиальный фибрillлярный кислый белок (GFAP)), мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), 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) эпизомные 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.

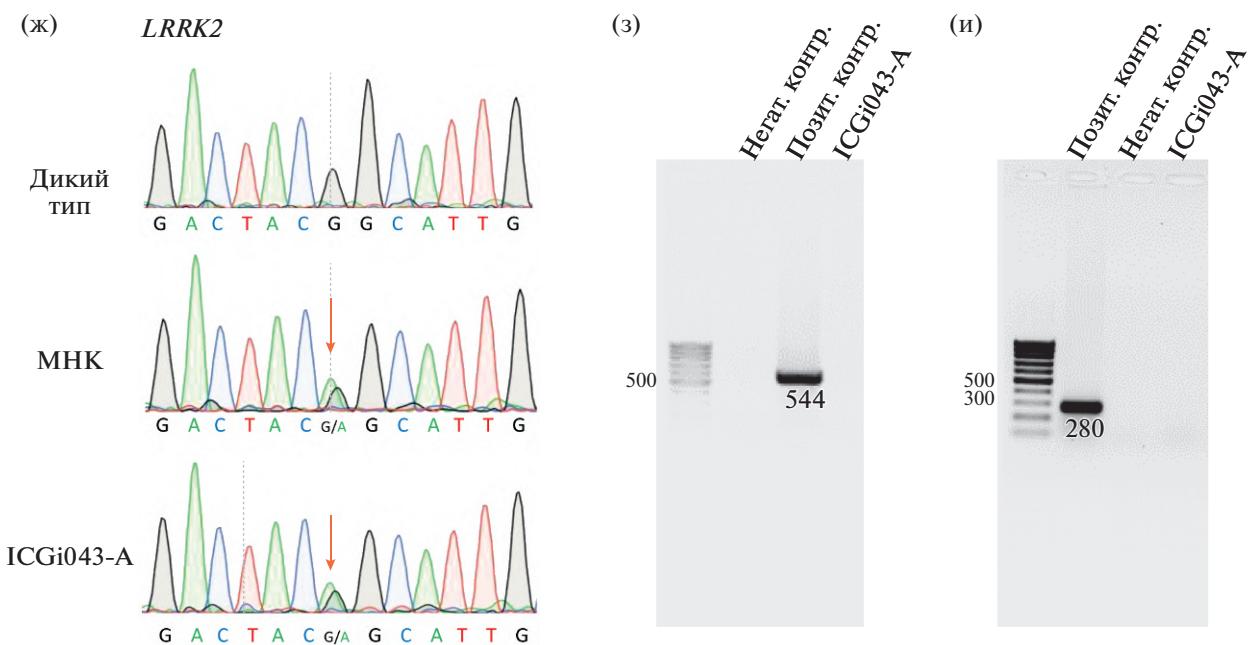


Рис. 1. Окончание.

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 кариотип (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 телец. Иммунофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (тубулина β 3 (TUBB3/TUJ1), глиальный фиброподилярный кис-

лый белок (GFAP)), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), поверхностный маркер CD90), энтодермы (SOX17, кератин 18 (KRT18)) (рис. 1е). Эписомные 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/ckptmbo/>), поддержанного Бюджетным проектом ИЦГ 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. Бехтеревой 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. Милюхиной. 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

- Pchelina S.N., Ivanova O.N., Emelianov A.K., Yakimovskii A.F.* Клиническое течение LRRK2-ассоциированной болезни Паркинсона // Журн. неврологии и психиатрии. 2011. Т. 12. С. 56–62.
- Chopra 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

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

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

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

*e-mail: evlena@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