







DOI 10.18699/vjgb-24-76

Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*

Е.В. Григорьева ^{1, 2} , А.А. Малахова ^{1, 2}, Е.С. Яркова^{1, 3}, Ю.М. Минина ¹, Ю.В. Вяткин⁴, Ю.А. Надточий^{1, 3}, Е.А. Хабарова^{1, 5}, Дж.А. Рзаев⁵, С.П. Медведев ^{1, 2}, С.М. Закиян ^{1, 2}


¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Новые Программные Системы», Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

 evlena@bionet.nsc.ru

Аннотация. Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17 – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся патологической агрегацией белка тау с образованием нейрофибриллярных клубков и дальнейшей гибелью нейронов. Наследственная форма лобно-височной деменции может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *MAPT* на хромосоме 17, кодирующий тау-белок. Поскольку на данный момент отсутствуют утвержденные медицинским сообществом способы борьбы с лобно-височной деменцией, исследование на клеточных моделях *in vitro* молекулярно-генетических механизмов, приводящих к развитию заболевания, поиск мишеней для терапевтического воздействия и возможность тестирования потенциальных лекарственных препаратов для предотвращения гибели нейронов являются актуальной задачей. Анализ данных секвенирования экзона 46-летней пациентки с клиническим диагнозом болезнь Паркинсона показал наличие патологического варианта с.2013T>G (rs63750756) в гене *MAPT*, который ассоциирован с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17. При помощи репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациентки нами были получены десять линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), из которых детально охарактеризованы две. Репрограммирование проводили с помощью трансфекции неинтегрирующимися эписомными векторами, которые экспрессируют белки OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и trp53DD. Линии ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B стабильно пролиферируют, образуют колонии с характерной для плюрипотентных клеток человека морфологией, имеют нормальный диплоидный кариотип (46,XX), экспрессируют эндогенную щелочную фосфатазу и маркеры плюрипотентности (OCT4, NANOG, SSEA-4 и TRA-1-60) и способны дифференцироваться в производные трех зародышевых листков: энто-, экто- и мезодерму. Благодаря тому, что ИПСК можно направленно дифференцировать в широкий спектр типов клеток, полученные в данной работе и детально охарактеризованные линии ИПСК являются уникальным инструментом для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17, а также тестирования потенциальных лекарственных препаратов *in vitro*.

Ключевые слова: лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ген *MAPT*.

Для цитирования: Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):679-687. DOI 10.18699/vjgb-24-76

Финансирование. Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063/10.

Благодарности. Анализ препаратов с иммунофлуоресцентным окрашиванием и дифференциальным окрашиванием хромосом проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmain/>), поддержанного бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0015).

Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene

E.V. Grigor'eva ^{1,2} , A.A. Malakhova ^{1,2}, E.S. Yarkova^{1,3}, J.M. Minina ¹, Y.V. Vyatkin⁴, J.A. Nadtochy^{1,3}, E.A. Khabarova^{1,5}, J.A. Rzaev⁵, S.P. Medvedev ^{1,2}, S.M. Zakian ^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ NOVEL Ltd., Novosibirsk, Russia

⁵ Federal Neurosurgical Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 evlena@bionet.nsc.ru

Abstract. Frontotemporal dementia with parkinsonism-17 is a neurodegenerative disease characterised by pathological aggregation of the tau protein with the formation of neurofibrillary tangles and subsequent neuronal death. The inherited form of frontotemporal dementia can be caused by mutations in several genes, including the *MAPT* gene on chromosome 17, which encodes the tau protein. As there are currently no medically approved treatments for frontotemporal dementia, there is an urgent need for research using *in vitro* cell models to understand the molecular genetic mechanisms that lead to the development of the disease, to identify targets for therapeutic intervention and to test potential drugs to prevent neuronal death. Analysis of exome sequencing data from a 46-year-old patient with a clinical diagnosis of Parkinson's disease revealed the presence of the pathological variant c.2013T>G (rs63750756) in the *MAPT* gene, which is associated with frontotemporal dementia with parkinsonism-17. By reprogramming the patient's peripheral blood mononuclear cells, we obtained induced pluripotent stem cells (iPSCs). Two iPSC lines were characterised in detail. Reprogramming was performed by transfection with non-integrating episomal vectors expressing the OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC and mp53DD proteins. The iPSC lines ICGi052-A and ICGi052-B proliferate stably, form colonies with a morphology characteristic of human pluripotent cells, have a normal diploid karyotype (46,XX), express endogenous alkaline phosphatase and pluripotency markers (OCT4, NANOG, SSEA-4 and TRA-1-60) and are able to differentiate into derivatives of three germ layers: ento-, ecto- and mesoderm. The iPSC lines obtained and characterised in detail in this work represent a unique tool for studying the molecular genetic mechanisms of the pathogenesis of frontotemporal dementia with parkinsonism-17, as well as for testing potential drugs *in vitro*.

Key words: frontotemporal dementia with parkinsonism-17; induced pluripotent stem cells; *MAPT* gene.

For citation: Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadtochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):679-687. DOI 10.18699/vjgb-24-76

Введение

Лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанная с хромосомой 17, впервые была описана Линчем и его коллегами в 1994 г. (Lynch et al., 1994). Этот наследуемый синдром деменции с ранним началом включает также паркинсонизм – комплекс симптомов, содержащий как немоторные проявления, например когнитивные нарушения, депрессии, биполярное расстройство, нарушения сна, так и моторные нарушения, такие как ригидность мышц, тремор в покое, брадикинезия. Ранние психические расстройства и изменения личности часто предшествуют выраженной деменции.

Ген *MAPT* кодирует белок тау, который регулирует сборку и стабилизацию микротрубочек, участвуя в передаче сигнала в центральной нервной системе и аксональном транспорте (Esmaeli-Azad et al., 1994). В мозге человека экспрессируются шесть изоформ тау-белка, благодаря альтернативному сплайсингу экзонов 2, 3 и 10 мРНК гена *MAPT*. Альтернативный сплайсинг экзона 10 приводит к

образованию тау-белка с тремя (3R) или четырьмя (4R) белковыми доменами, связывающими микротрубочки (MT-связывающие). Изоформы 4R тау демонстрируют повышенное сродство к микротрубочкам по сравнению с изоформами 3R. В детском возрасте в мозге преобладает форма 3R, в мозге взрослого человека формы 3R и 4R находятся в соотношении 1:1 (D'Souza, Schellenberg, 2006).

Генетический вариант *MAPT*:c.2013T>G (rs63750756, p.N279K) является миссенс-мутацией в экзоне 10 (Hasegawa et al., 1999), приводящей к замене аспарагина на лизин в позиции 279 белка *MAPT*. Вследствие этой замены происходит усиление полипуриново-положительного цис-элемента, присутствующего в 10-м экзоне, что увеличивает частоту включения экзона 10 в транскрипт во время сплайсинга (Ritter et al., 2018). В результате меняется соотношение форм 3R и 4R, что дестабилизирует микротрубочки, нарушает субклеточный транспорт везикул (Wren et al., 2015), вызывает образование нитевидных включений (Ghetti et al., 2015) и последующую гибель ней-

ронов. Кроме того, нейроны с данным генетическим вариантом характеризуются повышенными спонтанными колебаниями кальция, митохондриальной дисфункцией и повышенной продукцией активных форм кислорода, что также приводит к гибели клеток (Korn et al., 2023).

Вышеперечисленные процессы вызывают развитие лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17. Точный механизм развития болезни при этом генетическом варианте пока неизвестен, что не позволяет выработать схему лечения.

Для изучения развития лобно-височной деменции применяются различные модели. Прежде всего, это модели на животных, преимущественно на грызунах: лабораторных мышках и крысах. Грызунов активно используют для создания моделей нейродегенеративных заболеваний (Britti et al., 2020; Esteras et al., 2021). Также существуют трансгенные линии лабораторных животных, несущих генетические варианты, которые вызывают наследственную лобно-височную деменцию (Dawson et al., 2007). Однако эти модельные системы имеют некоторые ограничения, обусловленные различиями в признаках старения между мышками и людьми и даже различиями между tau-белком мыши и человека (Iovino et al., 2015; Hernández et al., 2020). Поэтому на сегодняшний день помимо животных моделей наиболее перспективными считаются модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – это клетки, полученные с помощью репрограммирования соматических клеток и характеризующиеся способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков подобно эмбриональным стволовым клеткам. ИПСК обладают всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток и при этом являются аутологичными по отношению к донору соматических клеток (Valetdinova et al., 2021). Такие клетки обладают большим потенциалом для персонализированной медицины, поскольку их можно получить в любой период жизни пациента и они будут пациент-специфичными. ИПСК позволяют обойти иммуногенные и этические проблемы, поэтому их востребованность растет. Теоретически ИПСК можно получить с помощью репрограммирования любого зрелого типа клеток, выделенного из организма. Для этого используют фибробласты, мононуклеарные клетки крови, кератиноциты, а также меланоциты.

Поскольку ИПСК могут быть дифференцированы в любой тип клеток, спектр их применения очень широк (Liu et al., 2020). Дифференцированные производные ИПСК, например нейрон-подобные клетки, можно применять для исследования молекулярно-генетических механизмов развития патологии, в том числе на ранних стадиях дифференцировки клеток, проводить поиск молекул-мишеней, а также тестировать различные химические соединения, являющиеся потенциальными лекарственными препаратами (Grigor'eva et al., 2023).

В настоящей работе нами были получены, охарактеризованы и паспортизованы две линии ИПСК пациента с патологическим генетическим вариантом *МАРТ:с.2013Т>G* (rs63750756, p.N279K), приводящим к развитию лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17. Полученные

линии ИПСК являются клеточной моделью для изучения механизмов развития данного заболевания, а также могут быть использованы для скрининга потенциальных лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Комитетом по этике научных исследований Федерального центра нейрохирургии (Новосибирск, Россия), протокол № 1 от 14 марта 2017 г. Образцы периферической крови пациентки были предоставлены Федеральным центром нейрохирургии (Новосибирск, Россия). Пациентка подписала информированное добровольное согласие и информационный лист.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови в градиенте фиколла. Забор периферической крови осуществлялся в два вакутейнера (вакуумные пробирки VACUETTE с K3EDTA, Greiner Bio) объемом 9 мл. Для выделения мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови насливали 3–4 мл крови на 3–4 мл раствора фиколла (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich или Биолот, плотность 1.077) и центрифугировали на центрифуге с медленным раскручиванием и остановкой ротора (SL 16 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific) при 400g 35–40 мин. Далее аккуратно собирали белесый ободок интерфазы, содержащий МНК, переносили в 15 мл пробирку и промывали дважды в максимальном объеме PBS с центрифугированием при 300g в течение 15–20 мин. МНК замораживали в среде, содержащей 90 % заменителя сыворотки KnockOut (Thermo Fisher Scientific) и 10 % ДМСО (Sigma-Aldrich), по 5–10 миллионов клеток на криопробирку.

Репрограммирование пациент-специфичных МНК и условия культивирования полученных ИПСК. Трансфекцию МНК проводили на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) с использованием эпсомных векторов (OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, mp53DD и EBNA1) (Addgene ID No. 41813–14, 41855–57), как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023). Для трансфекции 1×10^6 МНК брали по 0.5 мкг каждого из векторов, использовали программу: 1650 В, 10 мс, 3 импульса. Клетки сажали на обработанный митомицином С (Sigma-Aldrich) слой эмбриональных фибробластов (фидер). Индивидуальные колонии клеток пересаживали микрокапилляром в лунки 48-ячеечного планшета с заранее посаженным фидером и культивировали в среде для ИПСК DMEM/F12, содержащей 15 % KnockOut Serum Replacement, 1 % GlutaMAX-I, 0.1 mM NEAA, 1 % пенициллин-стрептомицин (все Thermo Fisher Scientific), 0.1 mM 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich) и 10 нг/мл bFGF (SCI Store). Колонии клеток пересаживали ферментативно с использованием TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) один раз в 4–5 дней в соотношении 1:8–1:10 с добавлением на сутки 2 мкг/мл ROCK ингибитора Thiazovivin (Sigma-Aldrich). Все клетки культивировали во влажной камере CO₂-инкубатора при 37 °C и 5 % CO₂.

Выявление эндогенной щелочной фосфатазы. Клетки фиксировали высушиванием на воздухе и окрашивали с использованием реагента SIGMAFAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) по протоколу производителя 10–15 мин

Таблица 1. Антитела, используемые в работе

Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности			
Rabbit IgG anti-OCT4	1:200	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
Rabbit IgG anti-NANOG		Abcam, ab62734	RRID:AB_956161
Mouse IgG3 anti-SSEA-4		Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
Mouse IgM anti-TRA-1-60		Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных			
Mouse IgG2a anti- α SMA	1:200	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
Mouse IgG1 anti-CD29 (Integrin beta 1) (TS2/16)	1:100	Thermo Fisher Scientific, 14-0299-82	RRID:AB_1210468
Chicken IgY anti-MAP2	1:1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
Mouse IgG2a anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/ Clone: TUJ1		BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1:250	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
Mouse IgG1 anti- HNF3 β /FOXA2	1:50	Santa Cruz Biotechnology, sc-374376	RRID:AB_10989742
Вторичные антитела			
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21124	RRID:AB_2535766
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21121	RRID:AB_2535764
Goat anti-Chicken IgY H&L, Alexa Fluor 488		Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653
Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21131	RRID:AB_2535771
Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488		Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568		Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157

в темноте при комнатной температуре (КТ). Промывали PBS и визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Для иммунофлуоресцентного анализа клетки сажали на 8-ячеечные планшеты Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific), фиксировали 10 мин при КТ в 4 % параформальдегиде (ПФА, Sigma-Aldrich), пермеабелизировали 30 мин при КТ в 0.5 % Тритон-Х100 (Sigma-Aldrich), инкубировали 30 мин при КТ с 1 % БСА (VWR). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С, вторичные антитела добавляли на 1.5 ч при КТ (табл. 1). Ядра контрастировали DAPI. Микроизображения были сделаны с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements Advanced Research, версия 4.30.

Спонтанная дифференцировка ИПСК в эмбрионных тельцах. Для выявления потенциала клеток давать три зародышевых листка проводили спонтанную дифференцировку ИПСК в эмбрионных тельцах, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2023). Коротко: клетки снимали 0.15 % коллагеназой IV типа (Thermo Fisher Scientific) и сажали на чашки, покрытые 1 % агарозой, в среду для культивирования ИПСК без добавления bFGF. Через

9–14 дней эмбрионные тельца переносили на покрытые матригелем (Corning) 8-ячеечные планшеты Chambered Coverglass и культивировали еще 7–9 дней. Далее фиксировали 4 % ПФА и выполняли иммунофлуоресцентное окрашивание. Список антител представлен в табл. 1.

Картирование линий ИПСК. Клетки наращивали до монослоя и рассаживали на четыре лунки 12-ячеечного планшета, покрытого белками экстраклеточного матрикса Matrigel (Corning), культивировали 48–72 ч в зависимости от скорости пролиферации клеток. За 2.5 ч до фиксации среду меняли на свежую, добавляли 3 мкг/мл бромистого этидия и 50 нг/мл коллемеида и оставляли клетки в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Затем клетки в лунках дезагрегировали 300 мкл TrypLE Express и заливали по 3 мл гипотонического раствора 0.28 % KCl на 20 мин при 37 °С, после чего добавляли 2 капли фиксатора Карнуа (3 части метанола, 1 часть ледяной уксусной кислоты); суспензию клеток аккуратно переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 7 мин при 1300 об/мин. Фиксировали клетки добавлением 1.5 мл свежего фиксатора Карнуа к осадку клеток в течение 15 мин на льду. Далее центрифугировали клетки 5 мин при 1300 об/мин, проводили две смены фиксатора Карнуа и раскапывали 70–80 мкл суспензии клеток на влажные охлажденные

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых в работе

Применение	Ген/локус	Размер продукта, п. н.	Прямой/обратный праймер (5'-3')
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Референсный ген (ОТ-кПЦР)	Бета-2-микроглобулин	90	TAGCTGTGCTCGGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (ОТ-кПЦР)	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGGCCTGAAGAAAAC/ AGGGCTGCTCCTGAATAAGCAG
	<i>OCT4</i>	94	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>SOX2</i>	100	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGCTACTCTGTTAACCTC
Подтверждение мутации	<i>MART:c.2013T>G</i>	427	TCGTAAGCCCGCTGGAAT/ GTGTACGCACTCACCACT

предметные стекла с высоты 10–20 см. Оставляли препараты высохнуть при комнатной температуре.

Для получения дифференциальной окраски хромосом препараты окрашивали раствором DAPI (200 нг/мл, в 2хSSC) в течение 5 мин. Затем препараты споласкивали в буфере 2хSSC и в воде. После высушивания препаратов на воздухе наносили 7–10 мкл антифейда (Vector) под покровное стекло.

Анализ хромосом проводили на микроскопе Axioplan 2 (Zeiss), оснащённом CCD камерой CV-M300 (JAI Corp.), в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов в Институте цитологии и генетики СО РАН. Для обработки метафаз и раскладывания хромосом использовали программное обеспечение ISIS 5 (MetaSystems Group).

Выделение геномной ДНК и РНК. Геномную ДНК выделяли из МНК и ИПСК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) или экстракцией с применением QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen). РНК выделяли с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Выявление патологического генетического варианта в пациент-специфичных МНК и полученных ИПСК. Секвенирование клинического экзона образцов ДНК пациентов проводили в ООО «Геноаналитика» (Москва). Геномная ДНК была фрагментирована ультразвуком на приборе Covaris S2 до среднего размера 300 нуклеотидов. После измерения концентрации 800 нг было взято для приготовления библиотек при помощи набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) согласно инструкции производителя. Далее полученная библиотека была гибридинизована с зондами, соответствующими белок-кодирующим частям генома человека, с использованием набора Sure Select AllExome V7 (Agilent) согласно инструкции. После гибридинизации библиотеку секвенировали парноконцевыми чтениями длиной 150 нуклеотидов на приборе HiSeq 2500 (Illumina). Необработанные данные секвенирования экзона пациента PD57 доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295,

образец SAMN42050731, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bio-sample/42050731>).

Для подтверждения наличия однонуклеотидного полиморфизма выполняли секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру, последовательности праймеров приведены в табл. 2. ПЦР проводили на термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2х) (ООО «Биолабмикс») и следующей программы: 95 °С – 3 мин; 35 циклов: 95 °С – 30 с, 68 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; и 72 °С – 5 мин. Продукты ПЦР очищали с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением с применением набора Cleanup mini («Евроген») по протоколу производителя. Реакции секвенирования по Сэнгеру осуществляли 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>).

Количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности. Обратную транскрипцию РНК проводили с помощью ревертазы M-MuLV («Биолабмикс»). Количественную ПЦР выполняли на приборе LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) с набором БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 2х («Биолабмикс») с использованием программы: 95 °С – 5 мин; 40 циклов: 95 °С – 10 с, 60 °С – 1 мин. Последовательности праймеров на гены плюрипотентности представлены в табл. 2. Значения СТ нормализовали к бета-2-микроглобулину с использованием $\Delta\Delta\text{CT}$ -метода.

ПЦР анализ для выявления эписом и микоплазмы. Детектировали контаминацию микоплазмой и наличие последовательностей эписом в клетках с помощью ПЦР (95 °С – 5 мин; 35 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 20 с) на термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

STR-анализ. Генотипирование исследуемых образцов ДНК выполняли в ООО «Геноаналитика» методом полимеразной цепной реакции с применением набора ПЦР реа-

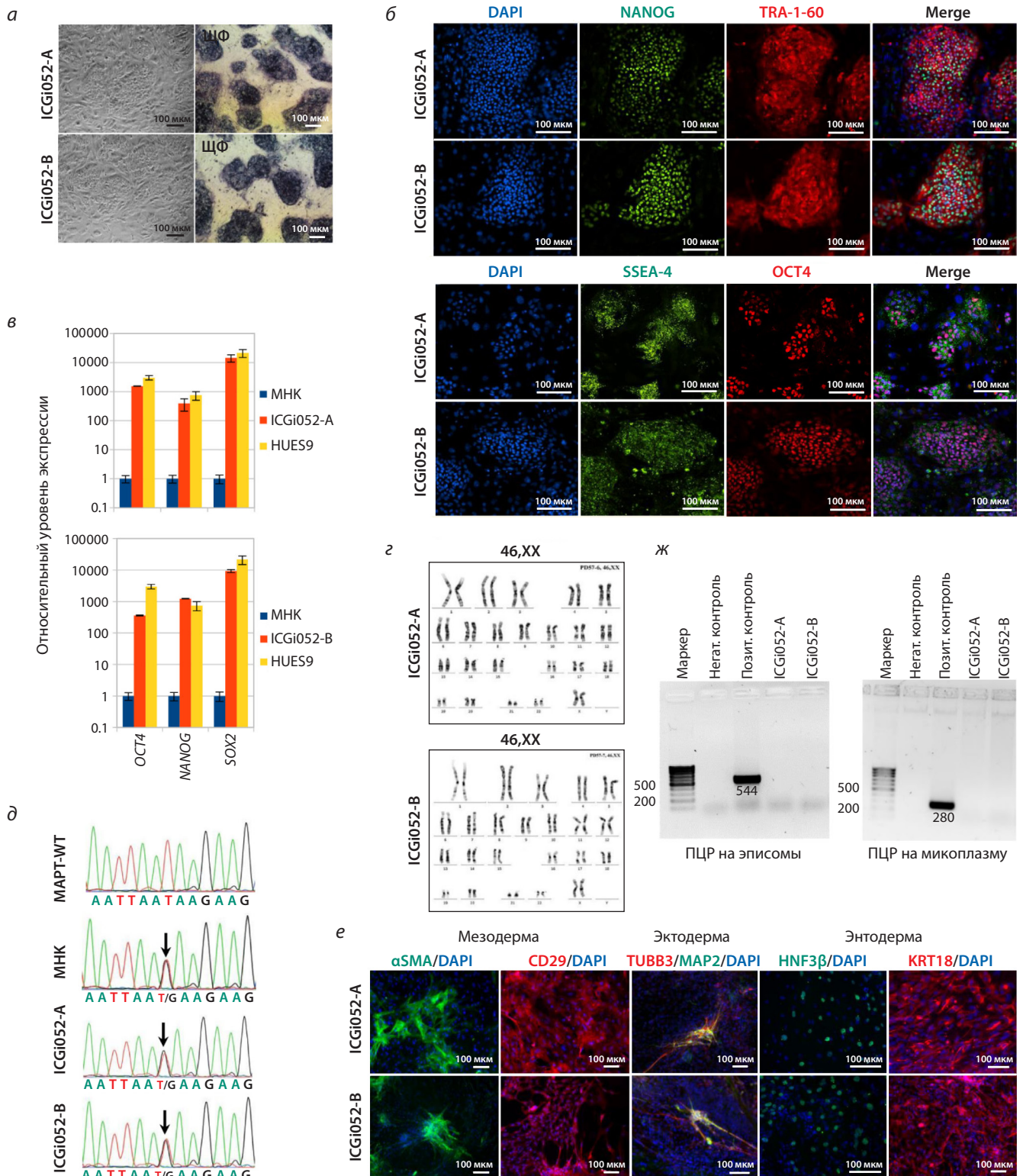
гентов для прямой амплификации COrDIS «ЭКСПЕРТ 26» (Россия) согласно протоколу фирмы-производителя, с последующим разделением продуктов амплификации на приборе для проведения капиллярного электрофореза 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems Group of The Applied Corporation, Япония, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2004/1586).

Результаты и обсуждение

При анализе результатов секвенирования экзомов пациентов Федерального центра нейрохирургии (Новосибирск) с клиническим диагнозом болезнь Паркинсона была обнаружена 46-летняя пациентка, имевшая патогенный генетический вариант (*c.2013T>G*, *rs63750756*) в гене *MAPT*, ассоциированный с лобно-височной деменцией с паркин-

Таблица 3. Паспорт клеточных линий ICGi052-A и ICGi052-B

Уникальный идентификатор	ICGi052-A, ICGi052-B
Альтернативное название линий	PD57-6, PD57-7
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: 46 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2021 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и <i>tp53DD</i>
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17
Ген/локус	<i>MAPT:c.2013T>G</i> , <i>rs63750756</i>
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных теллец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластах 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	ЭДТА 0.5 mM
Кратность посева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-A , https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-B
Дата паспортизации/депонирования	09.07.2024



Характеристика двух пациент-специфичных линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B.

а – морфология колоний клеток в фазовом контрасте и гистохимическое выявление эндогенной щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; **б** – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый сигнал), TRA-1-60 (красный), SSEA-4 (зеленый), OCT4 (красный сигнал); **в** – ПЦР в реальном времени на маркеры плюрипотентности (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B, МНК пациента и линии эмбриональных стволовых клеток HUES9; **г** – кариотипирование (DAPI-бэндинг) линий ИПСК: ICGi052-A на 18-м пассаже и ICGi052-B на 20-м пассаже; **д** – секвеннограммы участков гена *MART* (с.2013T>G) МНК пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, линий ИПСК ICGi052-A и ICGi052-B и здорового донора (*MART*-WT) (секвенирование по Сэнгеру), полиморфизм отмечен черной стрелкой; **е** – иммунофлуоресцентное окрашивание спонтанно дифференцированных в эмбриоидных тельцах клеток на маркеры трех зародышевых листков: эктодермы (*TUBB3* (красный сигнал), *MAP2* (зеленый)), мезодермы (*αSMA* (зеленый), *CD29* (красный)) и энтодермы (кератин 18/*KRT18* (красный сигнал), *HNF3β/FOXA2* (зеленый)). Ядра окрашены DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) (синий сигнал); **ж** – результат ПЦР анализа на эписомы в клетках и контаминацию микоплазмой в линиях полученных клеток. Все масштабные линейки – 100 мкм.

сонизмом-17. Первые признаки паркинсонизма у пациентки были обнаружены в 44 года. В семейном анамнезе все родственники по женской линии имели признаки заболевания.

Из периферической крови пациентки были выделены МНК и проведено репрограммирование при помощи трансфекции неинтегрирующимися эписомами, экспрессирующими OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD (Okita et al., 2013). В результате получено десять линий клеток. Начальные этапы анализа выявили две линии, которые отвечали всем требованиям, предъявляемым к плюрипотентным стволовым клеткам. Данные линии (ICGi052-A/PD57-6 и ICGi052-B/PD57-7) были охарактеризованы и зарегистрированы в Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Полная информация по линиям доступна в hPSCreg по ссылкам <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-A> и <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi052-B>.

Обе линии растут плотными однослойными колониями клеток с большим ядерно-цитоплазматическим соотношением и экспрессируют ранний маркер плюрипотентных клеток – эндогенную щелочную фосфатазу (см. рисунок, а). Культивирование осуществлялось на митотически инактивированных фибробластах мыши (или фидере). Иммунофлуоресцентный анализ линии клеток ICGi052-A (15-й пассаж) и ICGi052-B (16-й пассаж) на маркеры плюрипотентности показал наличие экспрессии поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1-60, а также транскрипционных факторов NANOG и OCT4 (см. рисунок, б). Количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-кПЦР) полученных линий на 15-м пассаже также демонстрировала значительное повышение уровня экспрессии генов *OCT4*, *NANOG* и *SOX2*, сопоставимое с уровнем экспрессии в контрольной линии эмбриональных стволовых клеток HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004) (см. рисунок, в). Анализ кариотипа, включающий 60 метафазных пластинок каждой линии клеток, показал, что линии клеток ICGi052-A на 18-м пассаже и ICGi052-B на 20-м пассаже имеют нормальные диплоидные кариотипы 46,XX (см. рисунок, г). Для подтверждения наличия в полученных линиях клеток патогенного полиморфизма было проведено секвенирование по методу Сэнгера и подтверждено, что обе линии, так же как и МНК пациента, несут замену с.2013T>G (см. рисунок, д, полиморфизмы отмечены черными стрелками).

Основным тестом на плюрипотентность полученных линий клеток является их способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, в связи с чем была проведена спонтанная дифференцировка в эмбриональных тельцах с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием на специфические маркеры. Обе линии клеток способны давать: эктодерму (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2)); энтодерму (ядерный фактор гепатоцитов 3 бета (HNF3β/FOXA2), кератин 18 (KRT18)); мезодерму (α-актин гладких мышц (αSMA), поверхностный маркер CD29) (см. рисунок, е).

В процессе культивирования все линии проходили ПЦР тест на контаминацию микоплазмой, который под-

тверждал ее отсутствие (см. рисунок, ж). Также к 19-му пассажу произошла элиминация эписомных векторов. STR-анализ коротких tandemных повторов по 25 полиморфным локусам на 15-м (для линии ICGi052-A) и 16-м (для линии ICGi052-B) пассажах показал идентичность пациент-специфичным МНК (данные доступны по запросу у авторов). Паспорт полученных клеточных линий представлен в табл. 3.

Заключение

Из МНК пациентки с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, имеющей патологический генетический вариант с.2013T>G (rs63750756) в гене *MAPT*, при помощи репрограммирования к плюрипотентному состоянию нами были созданы и детально охарактеризованы две линии ИПСК – ICGi052-A и ICGi052-B. Данные линии клеток отвечают всем критериям плюрипотентных клеток (имеют диплоидный кариотип, экспрессируют маркеры плюрипотентности и способны давать производные трех зародышевых листков) и являются уникальным молекулярно-генетическим инструментом для изучения *in vitro* развития патологии в нейральных производных, полученных при направленной дифференцировке ИПСК, а также тестирования новых фармакологических соединений. Исследуемые линии клеток зарегистрированы в международном Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg, а также включены в коллекцию клеток лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН и могут быть использованы для изучения механизмов развития таупатий.

Список литературы / References

- Britti E., Ros J., Esteras N., Abramov A.Y. Tau inhibits mitochondrial calcium efflux and makes neurons vulnerable to calcium-induced cell death. *Cell Calcium*. 2020;86:102150. DOI 10.1016/j.ceca.2019.102150
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C., Andrin R., Magtoto L. 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;12(5):301-308. DOI 10.1006/mcpr.1998.0186
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(13):1353-1356. DOI 10.1056/NEJMs040330
- Dawson H.N., Cantillana V., Chen L., Vitek M.P. The tau N279K exon 10 splicing mutation recapitulates frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 tauopathy in a mouse model. *J. Neurosci.* 2007;27(34):9155-9168. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5492-06.2007
- D'Souza I., Schellenberg G.D. Arginine/serine-rich protein interaction domain-dependent modulation of a tau exon 10 splicing enhancer: altered interactions and mechanisms for functionally antagonistic FTDP-17 mutations Δ280K and N279K. *J. Biol. Chem.* 2006;281:2460-2469. DOI 10.1074/jbc.M505809200
- Esmaeli-Azad B., McCarty J.H., Feinstein S.C. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell Sci.* 1994; 107(4):869-879. DOI 10.1242/jcs.107.4.869
- Esteras N., Kundel F., Amodeo G.F., Pavlov E.V., Klenerman D., Abramov A.Y. Insoluble tau aggregates induce neuronal death through modification of membrane ion conductance, activation

- of voltage-gated calcium channels and NADPH oxidase. *FEBS J.* 2021;288(1):127-141. DOI 10.1111/febs.15340
- Ghetti B., Oblak A.L., Boeve B.F., Johnson K.A., Dickerson B.C., Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by *microtubule-associated protein tau gene (MAPT)* mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015;41(1):24-46. DOI 10.1111/nan.12213
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S *GBA* variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):4437. DOI 10.3390/ijms24054437
- Hasegawa M., Smith M.J., Iijima M., Tabira T., Goedert M. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett.* 1999;443(2):93-96. DOI 10.1016/S0014-5793(98)01696-2
- Hernández F., Merchán-Rubira J., Vallés-Saiz L., Rodríguez-Matellán A., Avila J. Differences between human and murine tau at the N-terminal end. *Front. Aging Neurosci.* 2020;12:11. DOI 10.3389/fnagi.2020.00011
- Iovino M., Agathou S., González-Rueda A., Del Castillo Velasco-Herrera M., Borroni B., Alberici A., Lynch T., O'Dowd S., Geti I., Gaffney D., Vallier L., Paulsen O., Káradóttir R.T., Spillantini M.G. Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain.* 2015;138(11):3345-3359. DOI 10.1093/brain/awv222
- Korn L., Speicher A.M., Schroeter C.B., Gola L., Kaehne T., Engler A., Disse P., Fernández-Orth J., Csátori J., Naumann M., Seebohm G., Meuth S.G., Schöler H.R., Wiendl H., Kovac S., Pawlowski M. MAPT genotype-dependent mitochondrial aberration and ROS production trigger dysfunction and death in cortical neurons of patients with hereditary FTL. *Redox Biol.* 2023;59:102597. DOI 10.1016/j.redox.2022.102597
- Liu G., David B.T., Trawczynski M., Fessler R.G. Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications. *Stem Cell Rev. Rep.* 2020;16(1):3-32. DOI 10.1007/s12015-019-09935-x
- Lynch T., Sano M., Marder K.S., Bell K.L., Foster N.L., Defendini R.F., Sima A.A., Keohane C., Nygaard T.G., Fahn S., Mayeux R., Rowland L., Wilhelmsen K. Clinical characteristics of a family-with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex. *Neurology.* 1994;44(10):1878-1884. DOI 10.1212/wnl.44.10.1878
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells.* 2013;31(3):458-466. DOI 10.1002/stem.1293
- Ritter M.L., Avila J., García-Escudero V., Hernández F., Pérez M. Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutation localizes at the nuclear compartment. *Front. Cell. Neurosci.* 2018;12:202. DOI 10.3389/fncel.2018.00202
- Valetdinova K.R., Malankhanova T.B., Zakian S.M., Medvedev S.P. The cutting edge of disease modeling: synergy of induced pluripotent stem cell technology and genetically encoded biosensors. *Biomedicines.* 2021;9(8):960. DOI 10.3390/biomedicines9080960
- Wren M.C., Zhao J., Liu C.-C., Murray M.E., Atagi Y., Davis M.D., Fu Y., Okano H.J., Ogaki K., Strongosky A.J., Tacik P., Rademakers R., Ross O.A., Dickson D.W., Wszolek Z.K., Kanekiyo T., Bu G. Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol. Neurodegener.* 2015;10:46. DOI 10.1186/s13024-015-0042-7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.07.2024. После доработки 28.08.2024. Принята к публикации 02.09.2024.