

Создание клеточной модели болезни Паркинсона для изучения влияния мутации с.6055G>A в гене *LRRK2* на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона

Научный руководитель – Малахова Анастасия Александровна

Капитошина Елизавета Викторовна

Студент (магистр)

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

E-mail: kapitoshina@list.ru

Механизмы протекания многих нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона, до сих пор остаются неизвестными. Как правило в основе могут лежать разные процессы, такие как нейровоспаление, дисфункция митохондрий, а также окислительный стресс в нейронах. Исследовать патологические изменения в клетках позволяют клеточные модели, которые имитируют течение заболевания. А для того чтобы отследить в динамике и визуализировать клеточные процессы, применяют генетически-кодированные биосенсоры, которые клетка может экспрессировать самостоятельно. Использование клеточной модели со встроенным биосенсором позволит исследовать специфические пути развития патологии и раскрыть возможные механизмы возникновения болезни.

Целью нашего исследования стало создание клеточной модели болезни Паркинсона, несущей трансген биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона GRX1-roGFP2.

Ранее в лаборатории из образца периферической крови пациента с болезнью Паркинсона, несущего патогенную мутацию с.6055G>A в гене *LRRK2*, были выделены мононуклеарные клетки. С помощью эписомных векторов, содержащих факторы плюрипотентности, клетки пациента были репрограммированы, таким образом была получена линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток LR-21, которая использовалась в работе. В *AAVS1* локус полученной линии, встраивали последовательности биосенсоров окислительно-восстановительного потенциала глутатиона с цитоплазматической и митохондриальной локализацией. Для этого клетки линии LR-21 трансфицировали плазмидами, несущими конструкции биосенсора Cyto-GRX1-roGFP2 и Mito-GRX1-roGFP2, совместно с плазмидой, несущей тетрациклиновый трансактиватор, и плазмидой, кодирующей компоненты системы CRISPR/Cas9. После трансфекции клетки селектировали на антибиотиках: пурамицина дигидрохлорид (в концентрации 150 нг/мл) и неомицина сульфат (в концентрации 25 мкг/мл). Устойчивые колонии клеток были механически отобраны, и далее культивировались в присутствии доксициклина, который активировал экспрессию трансгена. Наличие нецелевых встроок трансгена и локуса *AAVS1* дикого типа (без встройки трансгена) проверяли методом ПЦР.

В результате трансфекции мы получили по 31 субклону со встройками Cyto-GRX1-roGFP2 и Mito-GRX1-roGFP2, все они были GFP-позитивные, т.е. можно было наблюдать зелёное флуоресцентное свечение клеток. Отсутствие нецелевых встроок и локуса дикого типа было установлено у 19 колоний с Cyto-GRX1-roGFP2 и 17 колоний с Mito-GRX1-roGFP2. В дальнейшем эти клетки планируется запустить в нейрональную дифференцировку для моделирования заболевания *in vitro* и изучения влияния мутации *LRRK2* (с.6055G>A) на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона.