

Оценка окислительного стресса в нейронах с вариантом G2019S LRRK2 с помощью генетически кодируемого биосенсора**Научный руководитель – Малахова Анастасия Александровна*****Капитошина Елизавета Викторовна****Студент (магистр)*

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

Новосибирск, Россия

E-mail: kapitoshina@list.ru

Ген *LRRK2* кодирует белок дардарин, участвующий во многих клеточных процессах, он располагается на внешней мембране митохондрий, связан с микротрубочками и аппаратом Гольджи. Мутации в гене *LRRK2* ведут к развитию болезни Паркинсона (БП), однако патогенез до конца не изучен [2]. Вероятно, патогенные генетические варианты приводят к нарушению лизосомальных функций, дисфункции митохондрий и высвобождению активных форм кислорода. Визуализировать клеточные процессы, в том числе и окислительный стресс возможно при помощи генетически-кодируемых биосенсоров, которые несут редокс-чувствительный флуоресцентный белок roGFP2. В составе биосенсора roGFP2 слит с глутаредоксином GRX1, который восстанавливает окисленный глутатион - один из главных компонентов антиоксидантной системы клетки, - при этом окисляя roGFP2. По соотношению окисленной и восстановленной форм сенсора можно судить об окислительно-восстановительном потенциале глутатиона. Биосенсор (GRX1-roGFP2) встроенный в линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их дифференцировка в дофаминергические нейроны, поможет изучить специфические пути и причины возникновения БП. Цель – создание клеточной модели, несущей трансген биосенсора GRX1-roGFP2 для изучения вклада *LRRK2* в окислительный стресс при болезни Паркинсона. С помощью трансфекции в локус *AAVS1* линии ИПСК с мутацией с.6055G>A (G2019S) в гене *LRRK2* [1] были интегрированы последовательности биосенсоров с цитоплазматической (Cyto-GRX1-roGFP2) и митохондриальной (Mito-GRX1-roGFP2) локализацией. Трансгенные линии ИПСК были запущены в дифференцировку для получения дофаминергических нейронов. Зрелые нейроны обрабатывали ротеноном – ингибитор комплекса I электрон-транспортной сети митохондрий, в течение суток. Изменение окислительно-восстановительного состояния биосенсора детектировали при возбуждении длиной волны 400 нм и 490 нм соответственно. По соотношению сигналов окисленной к восстановленной форме roGFP2 результаты достоверно отличаются в одной линии с Mito-GRX1-roGFP2. В линиях с Cyto-GRX1-roGFP2, а также в контрольных клетках достоверных отличий нет. Вероятно, для детекции окислительного стресса в клетках с помощью биосенсора необходимо изменить длительность обработки ротеноном. Разработка протокола добавления химических веществ к созданной клеточной модели в будущем позволит оценить вклад мутации *LRRK2* (с.6055G>A) на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона в дофаминергических нейронах. Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

Источники и литература

- 1) Григорьева Е.В. и др. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi043-A с помощью репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента с болезнью Паркинсона, ассоциированной с патологическим вариантом р.G2019S LRRK / Е.В. Григорьева // Онтогенез. -2023. –Т.54. - №1.-С. 79–86.

- 2) Berwick, D. et al. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: Research progresses, but the themes remain the same // Molecular Neurodegeneration – 2019. –V.14. - №1.-p.1-22.