

Получение и характеристика нейрональных клеток из ИПСК человека с мутацией в гене GNAO1 для моделирования наследственной эпилепсии

Научный руководитель – Лагарькова Мария Андреевна

Спирин Д.М.¹, Воловиков Е.А.², Бардина М.В.³, Поваров И.С.⁴, Майорова К.С.⁵

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: denspiry@yandex.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра генетики, Москва, Россия, *E-mail: volovikovea@gmail.com*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия, *E-mail: maryana.bardina@gmail.com*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра высшей нервной деятельности, Москва, Россия, *E-mail: povarovigor@mail.ru*; 5 - Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, *E-mail: yuryevaksenia@gmail.com*

Эпилепсии - группа распространенных заболеваний нервной системы различной этиологии. Ранняя эпилептическая энцефалопатия (РЭЭ) XVII типа - генетически детерминированная злокачественная эпилепсия, вызванная различными мутациями гена GNAO1, кодирующего α -субъединицу гетеротримерного комплекса G-белков с неизвестной функцией [1]. Существующие животные модели этого заболевания демонстрируют сходный фенотип, однако не полностью воспроизводят молекулярную патологию [2]. Таким образом, целью нашей работы стала разработка клеточной модели РЭЭ XVII типа. Работа проводилась на клеточном материале пациента мужского пола, больного РЭЭ XVII типа с точечной мутацией с.607G>A в гене GNAO1. Диагноз был поставлен в Институте педиатрии им. Ю.Е. Вельтищева, там же после подписания информированного согласия врачами был взят биоптат кожи. Из биоптатов выделили культуру фибробластов, которые были репрограммированы до плюрипотентного состояния вирусными векторами Сендай, несущими гены Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Характеристику трех полученных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) провели по международным стандартам: проверили экспрессию маркеров плюрипотентности на уровне мРНК (ОТ-ПЦР) и белка (иммуноцитохимическое окрашивание (ИЦХ)), а также провели ненаправленную дифференцировку в производные трех зародышевых листков через стадию эмбрионидных телец. На препаратах метафазных хромосом подтвердили нормальный кариотип, наличие гетерозиготной мутации установили по данным секвенирования. Направленной дифференцировкой из ИПСК получили 2D культуры нейрональных предшественников; часть клеток отобрали для получения 3D культур и культивировали на чашках со сверхнизкой адгезией. Культивированием в среде для созревания на стеклах, покрытых полиэтиленглицином, получили морфологически зрелые нейроны. Пэтч-кламп эксперименты на базе Научного центра неврологии выявили их электрофизиологическую активность нейронов, полученных из ИПСК пациента. ИЦХ полученных нейрональных культур показало экспрессию β 3-тубулина, а также присутствие белка GNAO1 в цитоплазме всех полученных нейрональных и глиальных клеток. Известно 2 транскрипционных варианта гена GNAO1 [3], различающихся по белок-кодирующей части, их функциональная значимость неизвестна. Экспрессию обеих изоформ в ИПСК, нейрональных предшественниках и органоидах доказали методом ОТ-ПЦР со специфичными праймерами. Последующие исследования локализации белка GNAO1 впервые показали его высокую концентрацию в ядрах ИПСК по сравнению с цитоплазмой.

Источники и литература

- 1) 1. Feng H. et al. A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder // Neurobiol Dis. 2018. 116:131-141
- 2) 2. Feng H. et al. Mouse models of GNAO1-associated movement disorder: Allele- and sex-specific differences in phenotypes // PLOS ONE. 2019. 14(1):e0211066
- 3) 3. Murtagh J.J. Jr et al. Different forms of Go alpha mRNA arise by alternative splicing of transcripts from a single gene on human chromosome 16 // Mol Cell Biol. 1991. 11(2):1146-1155