

Трансгенные клеточные линии для изучения взаимодействия тау-белка с микротрубочками и анализа дисфункции митохондрий, вызванной генетическим вариантом с.2013Т>G (p.N279K) в гене *MAPT*

Надточий Ю.*, Павлова С., Медведев С.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* y.nadtochii@g.nsu.ru

Ключевые слова: ЛВД-17; N279K; тау; MitoTimer

Мотивация и цель: Клеточные модели на основе нейрональных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека позволяют проводить биохимические, электрофизиологические и омиксные исследования, направленные на раскрытие механизмов патогенеза, реализующихся на клеточном уровне. Лобно-височная деменция (ЛВД) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием, одной из причин развития которого являются генетические варианты в гене *MAPT*. Этот ген расположен на 17-й хромосоме и кодирует белок тау, который регулирует сборку и стабилизацию микротрубочек, участвуя в передаче сигнала в ЦНС и аксональном транспорте.

Данная работа посвящена созданию клеточной модели на основе ИПСК, которая позволит изучить механизмы патогенеза при развитии лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17, вызванной генетическим вариантом с.2013Т>G (p.N279K) в гене *MAPT*, что может ускорить поиск лекарственных средств.

Методы и алгоритмы: Ранее в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН были получены линии ИПСК пациента с генетическим вариантом с.2013Т>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*. В данные линии ИПСК с помощью CRISPR-Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе AAVS1 внесли доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer. Затем трансгенные клоны были охарактеризованы для подтверждения статуса плюрипотентности и запущены в направленную дифференцировку в дофаминергические (ДА) нейроны. На терминальной стадии проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на выявление маркёров ДА-нейронов (TH, TUBB3/TUJ1, SOX6, OTX2).

Также для данного исследования проводили трансфекцию клеток линий НЕК плазмидными векторами для временной экспрессии TAU-3R и TAU-4R, меченых флуоресцентными белками TagRFP и TagGFP2 для изучения распределения тубулин-ассоциированных белков TAU в цитоплазме клеток.

Результаты: Генетический вариант с.2013Т>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT* вызывает повышение уровня транскриптов содержащих экзон 10 и, как следствие, повышение уровня экспрессии формы белка тау – TAU-4R. Данная форма белка характеризуется повышенной склонностью к агрегации, что приводит к нарушению аксонального транспорта, митохондриальной дисфункции, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. В ходе данного исследования было установлено, что TAU-3R демонстрирует характерный

паттерн распределения в цитоплазме клеток, по-видимому, вызванный ассоциацией с белками цитоскелета. Форма белка TAU-4R распределена более диффузно по цитоплазме клеток, что согласуется с литературными данными.

Были получены линии ИПСК пациента с вариантом p.N279K в гене *MAPT* и здорового донора, несущих доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer, который позволяет изучать биогенез митохондрий в живых клетках в режиме реального времени.

Выводы: Были получены клеточные линии для изучения молекулярно-генетических механизмов ЛВД-17, вызванной мутацией в гене *MAPT*, а также для тестирования потенциальных лекарственных препаратов.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Transgenic cell lines to study the interaction of tau protein with microtubules and to analyze mitochondrial dysfunction caused by the c.2013T>G (p.N279K) genetic variant in the *MAPT* gene

Nadtochy J.*, Pavlova S., Medvedev S.

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* y.nadtochii@g.nsu.ru

Key words: LVD-17; N279K; tau; MitoTimer

Motivation and Aim: Cellular models based on neuronal derivatives of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) allow biochemical, electrophysiological, and omics studies aimed at revealing the mechanisms of pathogenesis realized at the cellular level. Frontal temporal dementia (FTD) is a severe neurodegenerative disease, one of the causes of development of which are genetic variants in the *MAPT* gene. This gene is located on chromosome 17 and encodes a tau protein that regulates microtubule assembly and stabilization, participating in CNS signal transduction and axonal transport.

This work is devoted to the creation of a cell model based on iPSCs, which will allow us to study the mechanisms of pathogenesis in the development of frontal temporal dementia with parkinsonism-17 caused by the genetic variant c.2013T>G (p.N279K) in the *MAPT* gene, which may accelerate the search for drugs.

Methods and Algorithms: Previously, the laboratory of developmental epigenetics of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS obtained iPSC lines of a patient with the genetic variant c.2013T>G (rs63750756, p.N279K) in the *MAPT* gene. A doxycycline-guided MitoTimer biosensor transgene was introduced into these hPSC lines by CRISPR-Cas9-mediated homologous recombination at the AAVS1 locus. The transgenic clones were then characterized to confirm pluripotency status and triggered into directed differentiation into dopaminergic (DA) neurons. At the terminal stage, immunofluorescence staining was performed to detect markers of DA neurons (TH, TUBB3/TUJ1, SOX6, OTX2).

For this study, we also transfected HEK cells with plasmid vectors for temporary expression of TAU-3R and TAU-4R labeled with fluorescent proteins TagRFP and TagGFP2 to study the distribution of tubulin-associated TAU proteins in cell cytoplasm.

Results: The genetic variant c.2013T>G (rs63750756, p.N279K) in the MAPT gene causes an increase in the level of transcripts containing exon 10 and, as a consequence, an increase in the level of expression of the TAU-4R form of tau protein. This form of protein is characterized by increased tendency to aggregation, which leads to impaired axonal transport, mitochondrial dysfunction, which ultimately leads to cell death. In this study, we found that TAU-3R exhibits a characteristic distribution pattern in the cytoplasm of cells, apparently caused by association with cytoskeleton proteins. The TAU-4R protein form is distributed more diffusely throughout the cytoplasm of cells, consistent with literature data.

IPSC lines of a patient with the p.N279K variant in the MAPT gene and a healthy donor carrying the doxycycline-guided transgene biosensor MitoTimer, which allows studying mitochondrial biogenesis in living cells in real time, were obtained.

Conclusion: Cell lines were obtained to study the molecular genetic mechanisms of LVD-17 caused by a mutation in the MAPT gene and to test potential drugs.

Funding: The research was carried out with the financial support of the Fund for Scientific and Technological Development of Yugra within the framework of the scientific project No. 2023-573-05.