

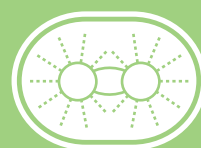
ISSN 0475-1450

Том 54, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



ОНТОГЕНЕЗ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 54, номер 6, 2023

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности эктопической экспрессии арил-гидрокарбонового рецептора человека, мыши и дрозофилы в тканях *Drosophila melanogaster*

Д. Ю. Баранова, А. А. Акишина, Р. О. Черезов, Д. А. Куликова, И. Б. Мерцалов,
О. Б. Симонова, Ю. Е. Воронцова

377

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Распространенность гена половой плазмы *germes* среди бесхвостых амфибий

В. В. Кондукторова, Е. Г. Фофанова, Д. А. Никишин

384

Предварительное воздействие ингибиторов деацетилаз гистонов изменяет направление дифференцировки ИПСК человека с формированием кардиосфер вместо кожных органоидов

В. К. Абдыев, А. А. Рябинин, Е. Д. Ерофеева, М. Д. Панкратова, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев

389

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Получение линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток iTAF15Xsk4 из фибробластов пациентки с микроделецией в Xq24

И. Е. Пристяжнюк, Н. И. Мещеряков, Т. В. Никитина, А. А. Кашеварова, Д. А. Федотов,
Е. Н. Толмачева, Л. И. Минайчева, Л. П. Назаренко, И. Н. Лебедев, А. Г. Мензоров

397

Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPCMi009-A-1 с нокаутом гена *UBE2A* с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9

Е. А. Хомякова, А. В. Федоренко, А. В. Сурдина, Е. А. Воловиков, Л. Д. Беликова,
Е. А. Зеркаленкова, М. А. Лагарькова, А. Н. Богомазова

405

Трансгенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 с доксициклин-управляемыми вариантами программируемой нуклеазы AsCas12a

С. В. Павлова, К. Р. Валетдинова, Т. Б. Маланханова, Д. Е. Полищев, А. А. Малахова,
Е. В. Григорьева, А. И. Шевченко, С. М. Закиян, С. П. Медведев

415

Contents

Vol. 54, No. 6, 2023

RESEARCH PAPERS

Ectopic Expression of Human, Mouse, and Fruit Fly Aryl Hydrocarbon Receptor in *Drosophila melanogaster* Tissues

D. Yu. Baranova, A. A. Akishina, R. O. Cherezov, D. A. Kulikova, I. B. Mertsalov, O. B. Simonova, and J. E. Vorontsova

377

SHORT COMMUNICATIONS

The Distribution of the Germ Plasm Gene *germes* among Anurans

V. V. Konduktorova, E. G. Fofanova, and D. A. Nikishin

384

Preliminary Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Changes the Direction of Human iPSCs Differentiation with the Formation of Cardiospheres Instead of Skin Organoids

V. K. Abdyev, A. A. Riabinin, E. D. Erofeeva, M. D. Pankratova, E. A. Vorotelak, and A. V. Vasiliev

389

PLURIPOTENT STEM CELL COLLECTION

Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Line iTAF15Xsk4 from Fibroblasts of a Patient with Microdeletion at Xq24

I. E. Pristyazhnyuk, N. I. Meshcheryakov, T. V. Nikitina, A. A. Kashevarova, D. A. Fedotov, E. N. Tolmacheva, L. I. Minaycheva, L. P. Nazarenko, I. N. Lebedev, and A. G. Menzorov

397

Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells Line (RCPCMi009-A-1) with Knockout of the *UBE2A* Gene by CRISPR/Cas9 Genome Editing

E. A. Khomyakova, A. V. Fedorenko, A. V. Surdina, E. A. Volovikov, L. D. Belikova, E. A. Zerkalenkova, M. A. Lagarkova, and A. N. Bogomazova

405

Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a

S. V. Pavlova, K. R. Valetdinova, T. B. Malankhanova, D. E. Polivtsev, A. A. Malahova, E. V. Grigor'eva, A. I. Shevchenko, S. M. Zakian, and S. P. Medvedev

415

ОСОБЕННОСТИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА, МЫШИ И ДРОЗОФИЛЫ В ТКАНЯХ *Drosophila melanogaster*

© 2023 г. Д. Ю. Баранова^{а, #}, А. А. Акишина^{б, #}, Р. О. Черезов^б, Д. А. Куликова^б, И. Б. Мерцалов^б,
О. Б. Симонова^б, Ю. Е. Воронцова^{б, *}

^аИнститут биологии и химии, ФГБОУ ВО “Московский педагогический государственный университет”,
ул. Малая Пироговская, 1, стр. 1, Москва, 119992 Россия

^бФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: vorontsova@idbras.ru

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 17.08.2023 г.

Арил-гидрокарбонный (диоксиновый) рецептор Aryl hydrocarbon receptor, AHR является лиганд-зависимым транскрипционным фактором, чьи гены-мишени играют основополагающую роль в детоксикации организма, регуляции процессов развития, поддержании гомеостаза, а также в возникновении онкологических и аутоиммунных заболеваний и метаболизме лекарственных соединений. Высокий консерватизм AHR позвоночных позволил нам исследовать его функции *in vivo*, используя особей *Drosophila melanogaster*, трансформированных геном AHR человека или мыши, и сравнить эктопический эффект их экспрессии с экспрессией гена *spineless*, гомолога AHR дрозофилы. В работе впервые показано, что в эмбриогенезе дрозофилы, в ножных имажинальных дисках и в соматических клетках половой системы самок AHR позвоночных проявляет свою функциональную активность в отсутствие экзогенных лигандов.

Ключевые слова: арил-гидрокарбонный рецептор AHR, *spineless*, эктопическая экспрессия, лиганд, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145023060034, **EDN:** GEJATJ

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых факторов регуляции метаболического ответа клеток эукариот на действие ксенобиотиков является арил-гидрокарбонный (диоксиновый) рецептор (AHR). В неактивном состоянии AHR присутствует в цитозоле клетки в виде белкового комплекса, в результате связывания с лигандами экзо- или эндогенной природы он активируется, претерпевает конформационные изменения и перемещается в ядро, где связывается с диоксин-чувствительными элементами в промоторах генов-мишеней и активирует их транскрипцию (Denison, Nagy, 2003). AHR играет важную роль в ряде биологических процессов, среди которых регуляция иммунного ответа, детоксикация ксенобиотиков, регуляция процессов развития, поддержание гомеостаза и поляризация клеток (Lin et al., 2022). AHR также активируется при клеточном стрессе, изменяя экспрессию соответствующих генов и вызывая остановку клеточного цикла (Wright et al., 2017). Кроме того,

AHR обеспечивает восприятие организмом изменения циркадного ритма, модулируя экспрессию генов антиоксидантной системы и, соответственно, регулируя функции клеток, обеспечивающих защиту от окислительного стресса (Vogel et al., 2020). Постоянные колебания уровня AHR в клетках не несут серьезных последствий для организма, однако увеличение его концентрации приводит к возникновению тех или иных нарушений развития на стадии закладки органов и тканей, а также негативно отражается на функционировании важнейших систем эукариот: нервной, иммунной, генеративной, сердечно-сосудистой и эндокринной (Vogel et al., 2020; Lin et al., 2022). Понижение же уровня его экспрессии часто сопровождается возникновением онкологических заболеваний и нарушением защитных функций организма в результате токсического воздействия ксенобиотиков (Vogel et al., 2020; Zhang et al., 2023). Однако, на сегодняшний день данных о регуляции функций AHR в организме животных недостаточно. В частности, неизвест-

[#] Авторы внесли одинаковый вклад.

ны эндогенные факторы, способные контролировать его активность.

Наиболее изучены белки AHR у позвоночных, в частности у мыши и человека. Несмотря на высокую гомологию лиганд-связывающего PAS-домена у AHR мыши и человека, его аффинность к лигандам может быть разная (Flaveny, Perdew, 2009; Xu et al., 2021). Чаще всего эксперименты выполняют на клеточных культурах, что ограничивает понимание последствий эктопической экспрессии AHR на процессы развития в условиях *in vivo*. Целью настоящей работы является сравнение влияния эктопической экспрессии AHR мыши и человека в организме дрозодилы. Это позволит создать модельную систему для поиска высококонсервативных эндогенных лигандов арил-гидрокарбонового рецептора. Использование трансгенных линий *Drosophila melanogaster* открывает возможности для более точной оценки последствий влияния эктопической экспрессии AHR на процессы развития организма в условиях *in vivo*, что имеет большое преимущество перед исследованиями, проводимыми на клеточных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались трансформированные линии дрозодил с индуцибельной экспрессией генов AHR человека (*hAHR*), мыши (*mAHR*) и дрозодилы (*spineless*, *ss*, гомолог AHR), поставленные под контроль индуцибельного дрожжевого энхансерного элемента *UAS*, позволяющего активировать их при помощи *GAL4*-тканеспецифических драйверов (Brand, Perimon, 1993). Репортерная линия *UAS-hAHR* создана нами ранее (Akishina et al., 2017), линии *UAS-mAHR* и *UAS-ss* описаны и любезно предоставлены коллегами из Университета Сассекса (Cespedes et al., 2010).

Для активации транскрипции генов *hAHR*, *mAHR* и *ss* в геноме дрозодилы использовались следующие *GAL4*-драйверные линии: *GMR-GAL4* (генотип: $p\{w^{+m}GAL4-ninaE.GMR\}12$) — обеспечивает тканеспецифическую экспрессию в глазных структурах; *Tub-GAL4* (генотип: $p\{w^{-tub}P-GAL4\}LL7/TM6,Tb$) — обеспечивает индукцию убиквитарной экспрессии; *Dll-GAL4* (генотип: $P\{GawB\}Dll^{md23}/CyO$) — обеспечивает индукцию в ножных имажинальных дисках; *Tj-GAL4* (генотип: $p\{tj-GAL4.U\}$) — обеспечивает индукцию в соматических клетках половой системы дрозодилы; *GawBDJ695-GAL4* (генотип: $p\{GawB\}DJ695$) — обеспечивает индукцию в нервной системе имаго; *GawB389-GAL4* (генотип: $w^{*}; p\{w^{+m}W.hs = GawB\}389$) — обеспечивает индукцию в нервной системе эмбрионов. Все драйверные линии получены из мировой коллекции (Bloomington *Drosophila* Stock Center, США).

Для индукции экспрессии репортерных трансгенных конструкций виргинных самок каждой из драйверных линий скрещивали с самцами из репортерных линий. Все скрещивания проводили при температуре 25°C на стандартной питательной среде.

Для экспериментов по оценке выживаемости дрозодил и определения стадии летальности предварительно были получены особи: 1) *UAS-ss*; *UAS-GFP*, 2) *UAS-hAHR*; *UAS-GFP*, 3) *UAS-mAHR*; *UAS-GFP* с дополнительной индукцией флуоресцентного белка GFP для визуализации особей нужного генотипа на ранних стадиях развития. В экспериментах с линиями *Dll-Gal4*, *GawBDJ695-GAL4* и *GawB389-GAL4* особей второй личиночной стадии развития, переносили на кормовую среду в пробирки и содержали в термостатах при температуре 25 или 18°C до стадии имаго. При температуре 18°C эффективность активации экспрессии трансгенов в температурно-зависимой системе *GAL4/UAS* снижается (Brand, Perimon, 1993), что позволило нам добиться выживаемости в тех случаях, когда мы наблюдали 100% гибель при 25°C. Частоту выживших особей определяли относительно общего количества пересаженных личинок. В качестве контрольного эксперимента использовали линии y^1w^1 и *UAS-GFP*. Размер выборки составлял от 40 до 50 мух каждого генотипа. Эксперименты были проведены в двух–трех повторностях.

Для экспериментов по оценке фертильности особей отбирали виргинных самок интересующего нас фенотипа и скрещивали с самцами дикого типа в пробирке. В каждую пробирку помещали одну самку и три самца. Через несколько дней пробирки проверяли на наличие в корме личинок. Частоту стерильных особей определяли относительно всего количества тестируемых самок. В качестве контрольного эксперимента скрещивали мух линии y^1w^1 с особями драйверной линии *Tj-GAL4*. Размер выборки составлял от 40 до 50 мух каждого генотипа.

Для окрашивания яичников 3–4 дневных самок препарировали в фосфатно-солевом буфере PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде и окрашивали ДНК-специфичным красителем DAPI (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США).

Микроскопический анализ яичников проводили в центре коллективного пользования ИБР РАН на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 880, глазных структур — в ЦКП ИМБ РАН с помощью микроскопа Keyence VHX 1000e.

Доменную организацию белков AHR и долю идентичных аминокислот в доменах определяли с помощью базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция убиквитарной эктопической экспрессии (*Tub-GAL4*) *hAHR*, *mAHR* и *ss* приводила к 100% гибели особей. Однако в случае эктопической экспрессии *ss* гибель происходила уже на эмбриональной стадии развития, тогда как особи с убиквитарной экспрессией *hAHR* доживали до второй личиночной стадии, а при экспрессии *mAHR* — до стадии имаго, хотя и в единичных случаях (рис. 1а).

При индукции *UAS-ss*, *UAS-hAHR* и *UAS-mAHR* в ножных имажинальных дисках с помощью драйвера *Dll-GAL4* наблюдали 100% гибель на стадии куколки при температуре 25°C (рис. 1б) и 95% при 18°C. Выжившие особи (5%) имели редуцированные дистальные и медиальные структуры ног.

Экспрессия *UAS-ss* в нервной системе эмбриона (*GawBDJ695-GAL4*) привела к гибели особей на стадии куколки (рис. 1в). Причем смертность в этом случае зависела от температуры, при которой развивались организмы: 100% при 25°C, 79% при 18°C. Экспрессия же в нервной системе имаго (*GawB389-GAL4*) не привела к каким-либо морфологическим нарушениям. Экспрессия *mAHR* в нервной системе эмбриона привела к нарушению сегментации брюшка у имаго, однако данная аномалия в целом никак не повлияла на жизнеспособность (рис. 1в). Интересно, что индукция *hAHR* в нервной системе эмбрионов и имаго не вызвала видимых нарушений, что, вероятно, говорит об отсутствии каких-либо эндогенных лигандов, способных активировать *hAHR* в нервной системе дрозофилы.

Индукция экспрессии *hAHR*, *mAHR* и *ss* в глазных структурах (*GMR-GAL4*) повлияла на развитие глазных структур только в случае *ss* (рис. 2а–2г). У дрозофил с генотипом *UAS-ss*; *GMR-GAL4* наблюдали фенотип грубых глаз, характеризующийся нарушением рядности омматидий, их пигментации и возможно, потерей цветового зрения. Известно, что именно уровень белка Ss необходим для определения будет ли развивающийся омматидий воспринимать коротковолновый (бледный) или длинноволновый свет (желтый) (Wernet et al., 2006). Вероятно, дополнительная экспрессия транскрипционного фактора Ss в наших экспериментах приводит к нарушению мозаичной структурной организации омматидий, необходимой для цветового зрения мух.

Интересные результаты были получены при индукции экспрессии исследуемых генов в яичниках с помощью драйвера *Tj-GAL4*. При индукции экспрессии *ss* и *hAHR* в соматических клетках половой системы самок было отмечено нарушение оогенеза, которое вызвало 100% стерильность особей. В яичниках подопытных мух наблюдались многочисленные нарушения при формиро-

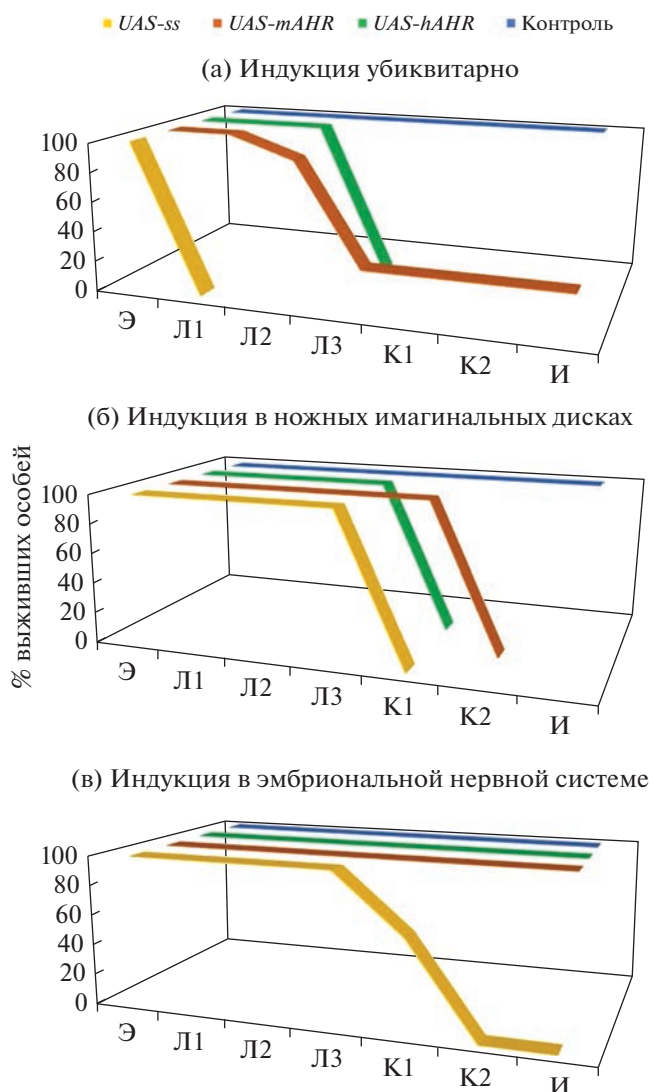


Рис. 1. Графики выживаемости особей в условиях развития 25°C при индукции экспрессии трансгенов: убиквитарно, драйвер *Tub-GAL4* (а); в ножных имажинальных дисках, драйвер *Dll-GAL4* (б); в эмбриональной нервной системе, драйвер *GawBDJ695-GAL4* (в). На оси абсцисс показаны стадии развития дрозофилы: Э — эмбрион, Л1–Л3 — личинки 1–3 возраста, К1 — ранняя куколка, К2 — поздняя куколка, И — имаго. На оси ординат — процент выживших особей.

вании слоя фолликулярных клеток, деградация яйцевых камер с образованием пикнотических ядер трофоцитов, нарушение созревания ооцитов, а также, отсутствие перемычек между яйцевыми камерами (рис. 2д–2з). При этом, эктопическая экспрессия *mAHR* никак не повлияла на фертильность самок.

Суммируя наши результаты, можно заключить, что самые обширные нарушения развития органов и тканей вызывала индукция эктопической экспрессии *spineless*. Это, видимо, связано с участием Ss в процессах онтогенеза и способно-

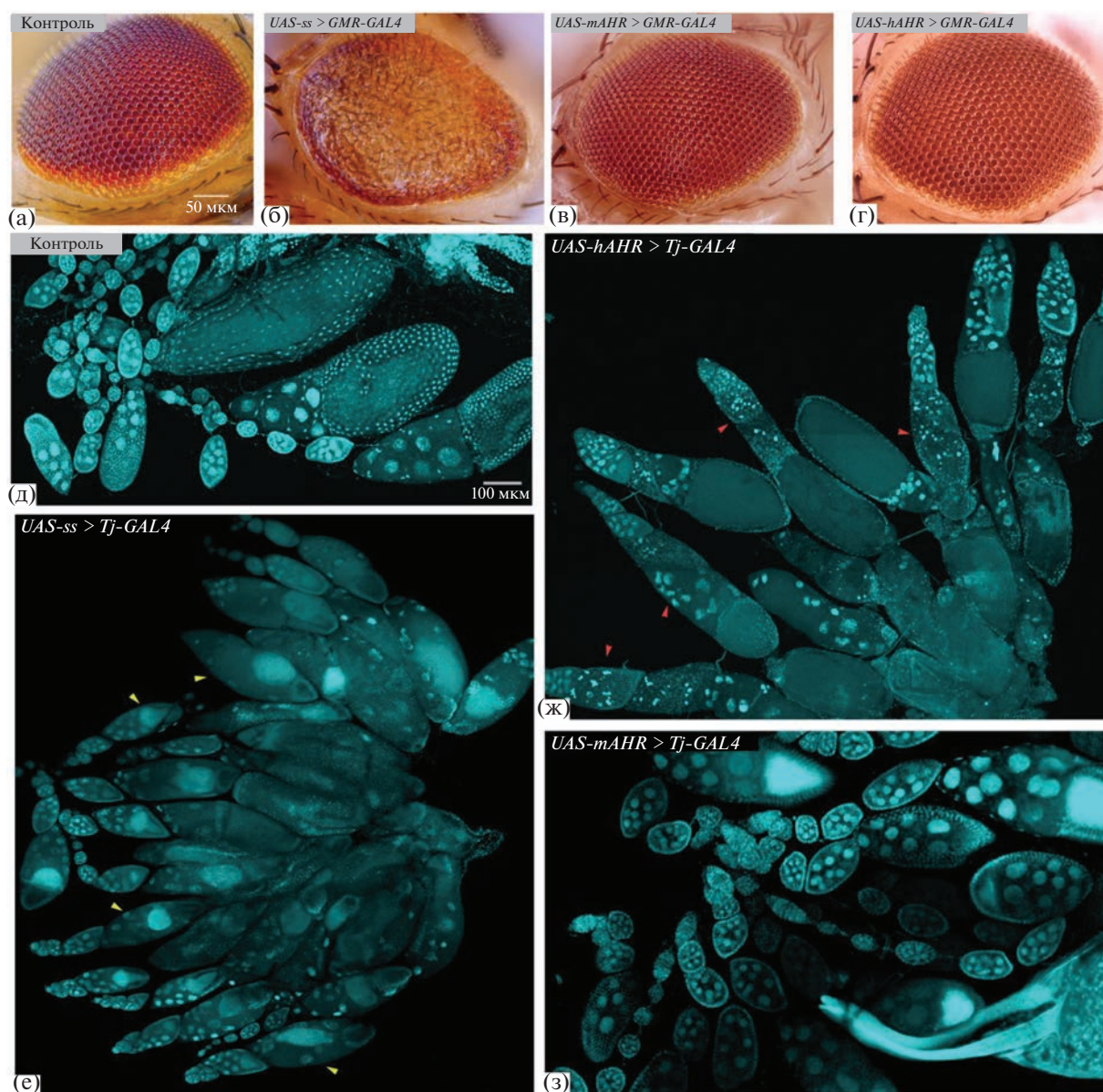


Рис. 2. Фенотипическое проявление эктопической экспрессии арил-гидрокарбонового рецептора дрозофилы, мыши и человека. (а–г) Результат индукции экспрессии *AHR* в глазных структурах с помощью драйверной линии *GMR-GAL4*, (д–з) в соматических клетках половой системы самок, драйвер *Tj-GAL4*. Желтыми стрелками показаны яйцевые камеры с нарушением созревания ооцита, красными стрелками — яйцевые камеры, содержащие пикнотические ядра трофобlastов. (а, д) Контрольная линия, (б, е) экспрессия гена *ss* дрозофилы, (в, з) *mAHR* мыши, (г, ж) *hAHR* человека.

стью *Ss* проявлять активность в отсутствие экзогенных лигандов, что отличает *Ss* от *AHR* позвоночных. Ранее было показано, что *Spineless* контролирует развитие дистальной части антенны, тарсальных сегментов ног, формирование механо-сенсорных органов и щетинок. Он также участвует в развитии эмбриональной периферической нервной системы (ПНС) и мозаичного глаза насекомых (Кузин и др., 1991; Duncan et al., 1998; Emmons et al., 1999; Wernet et al., 2006). В данной работе мы показали, что эктопическая экспрессия *spineless* приводит к гибели особей на

эмбриональной стадии при убиквитарной индукции и на стадии куколки при индукции экспрессии в имажинальных дисках ног и в нервной системе эмбрионов. Эктопическая экспрессия *ss* также вызывает нарушения развития глазных структур и яичников, но не влияет на нервную систему взрослых особей.

Как и *AHR*, белок *Ss* принадлежит к семейству bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim) (Duncan et al., 1998; Emmons et al., 1999). Исследования, проведенные как *in vitro*, так и *in vivo*, показали, что функциональная активность *Ss* возмож-

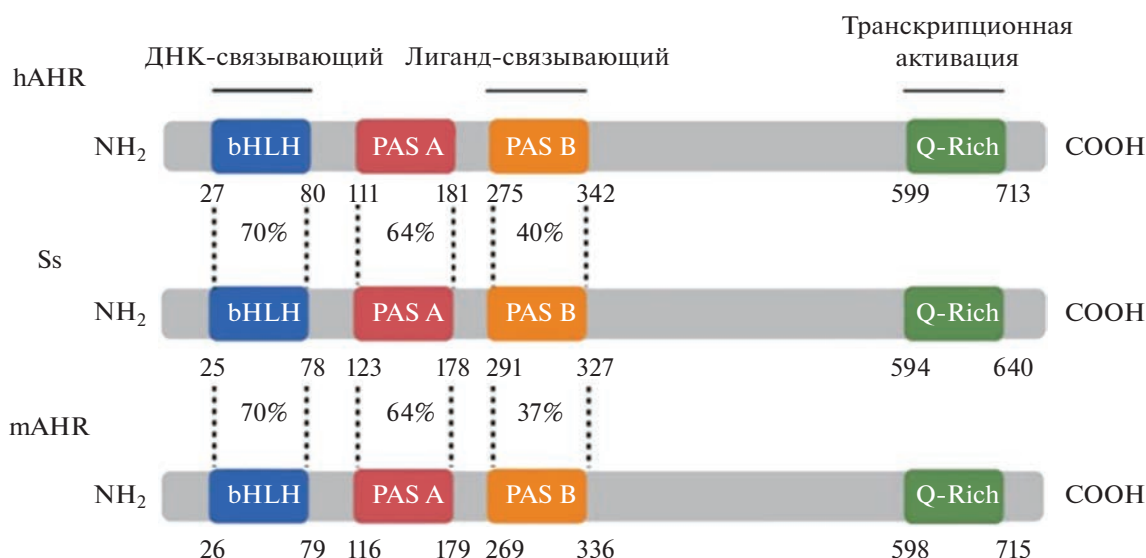


Рис. 3. Доменная организация гомологичных белков AHR и их консервативность. Цифрами обозначены границы доменов в последовательностях аминокислот. В процентах указана доля идентичных аминокислотных остатков. Ss — spineless, гомолог AHR дрозофилы; mAHR — AHR мыши; hAHR — AHR человека.

на при его димеризации с Tango (Tgo), другим bHLH-PAS белком. Возникший димер Ss::Tgo перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов-мишеней (Emmons et al., 1999; Kozu et al., 2006). У позвоночных для активации AHR необходимо предварительное связывание его с лигандом, потом транспортировка в ядро, где происходит димеризация с ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator) (Bacsi, Hankinson, 1996; Denison et al., 2003), являющимся ортологом белка Tango дрозофил (Sonnenfeld et al., 1997). При использовании трансформированных линий дрозофил с индуцибельной экспрессией гена *AHR* мыши, было показано, что AHR мыши способен образовывать димер с Tango и выполнять функции, сходные с Ss в процессах развития (Cespedes et al., 2010).

Лиганд-связывающие домены Ss дрозофилы, AHR мыши и человека имеют относительно высокую идентичность аминокислотного состава (37–40%) (рис. 3). Тем не менее, ранее было показано, что Ss конститутивно активен, а присутствие экзогенных лигандов, в частности, диоксина (наиболее изученного лиганда AHR), не влияет на его функциональную активность (Cespedes et al., 2010). Исследования, проведенные на других беспозвоночных модельных организмах, таких как *Caenorhabditis elegans* и *Mya arenaria*, также показали, что гомологи AHR у беспозвоночных не играют значимой роли в детоксикации, а их активация не зависит от экзогенных лигандов (Powell-Coffman et al., 1998; Butler et al., 2001). Данные результаты позволили предположить, что функция детоксикации была приобретена белком AHR в ходе эволюции только у позвоночных животных,

а участие в контроле онтогенеза является эволюционно древней функцией.

Однако, эти факты не исключают того, что у беспозвоночных животных существует свой спектр эндогенных лигандов, способных активировать сигнальный путь арил-гидрокарбонового рецептора, которые, возможно, эволюционно консервативны. Наши результаты предполагают, что в организме дрозофил существуют тканеспецифичные лиганды, способные активировать арил-гидрокарбоновый рецептор позвоночных. Менее выраженные фенотипические нарушения при эктопической экспрессии mAHR по сравнению с hAHR можно объяснить отличающейся конформацией его лиганд-связывающего домена. Этот домен, видимо, имеет более низкую аффинность к эндогенным лигандам в исследуемых органах и тканях дрозофилы. Ранее на культурах клеток была показана разница в аффинности некоторых лигандов между арил-гидрокарбоновым рецептором человека и мыши (Flaveny, Perdew, 2009; Murray et al., 2014).

Полученные результаты позволяют расширить поиск новых лигандов AHR и открыть новые возможности для изучения его эволюционно консервативных функций в процессах развития *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Михаилу Владимировичу Тростникову (НИЦ “Курчатовский институт” — ИМГ, г. Москва) и мировому банку линий дрозофил в Блумингтоне США за предоставление драйверных линий дрозофил. Данное исследование было

выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН и ЦКП ИМБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0007.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования беспозвоночных животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.Ю. Баранова и А.А. Акишина выполняли основную экспериментальную работу, участвовали в обсуждении результатов и написании статьи. Д.А. Куликова проводила микроскопический анализ глазных структур. Р.О. Черезов консультировал по ходу работы, участвовал в обработке данных и обсуждении результатов. О.Б. Симонова инициировала написание статьи, участвовала в обсуждении результатов и редактировала текст. Ю.Е. Воронцова планировала и выполняла эксперименты, анализировала результаты и участвовала в обсуждении и написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кузин Б.А., Досжанов К.Т., Симонова О.Б. Новый аллельный вариант *scd*⁴ гена и его вовлеченность в контроль пролиферации стволовых клеток ножных и антенных имажинальных дисков *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 1991. Т. 22. С. 212–217.
- Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O. et al. Xenobiotic-induced activation of human aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // Oncotarget. 2017. V. 8 (61). P. 102934–102947.
- Bacsi S.G., Hankinson O. Functional Characterization of DNA-binding Domains of the Subunits of the Heterodimeric Aryl Hydrocarbon Receptor Complex Imputing Novel and Canonical Basic Helix-Loop-Helix Protein-DNA Interactions // J. Biological Chemistry. 1996. V. 271. P. 8843–8850.
- Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. V. 118. P. 401–415.
- Butler R.A., Kelley M.L., Powell W.H., Hahn M.E., Van Beneden R.J. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding // Gene. 2001. V. 278. P. 223–234.
- Céspedes M.A., Galindo M.I., Couso J.P. Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor // PLoS One. 2010. V. 5 (11). P. 15382.
- Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2003. V. 43. P. 309–334.
- Duncan D.M., Burgess E.A., Duncan I. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless–aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor // Genes Dev. 1998. V. 12. (9). P. 1290–1303.
- Emmons R.B., Duncan D., Estes P.A. et al. The Spineless-Aristapedia and Tango BHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila* // Development. 1999. V. 126. P. 3937–3945.
- Flaveny C.A., Perdew G.H. Transgenic humanized AHR mouse reveals differences between human and mouse AHR ligand selectivity // Mol. Cell Pharmacol. 2009. V. 1. P. 119–123.
- Kozu S., Tajiri R., Tsuji T. et al. Temporal regulation of late expression of Bar homeobox genes during *Drosophila* leg development by Spineless, a homolog of the mammalian dioxin receptor // Developmental Biology. 2006. V. 294 (2). P. 497–508.
- Lin L., Dai Y., Xia Y. An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the last two decades (2002–2022): A medicinal chemistry perspective // Med. Chem. 2022. V. 244. P. 114845.
- Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. P. 801–814.
- Powell-Coffman J.A., Bradfield C.A., Wood W.B. *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 2844–2849.
- Sonnenfeld M., Ward M., Nystrom G. et al. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development // Development. 1997. V. 124 (22). P. 4571–4582.
- Vogel C.F.A., Van Winkle L., Esser C. et al. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses // Redox Biol. 2020. V. 34. P. 101530.
- Wernet M.F., Mazzoni E.O., Celik A. et al. Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision // Nature. 2006. V. 440. P. 174–180.
- Wright E.J. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways // Curr. Opin Toxicol. 2017. V. 2. P. 87–92.
- Xu X., Zhang X., Yuan Y. et al. Species-specific differences in aryl hydrocarbon receptor responses: How and why? // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 13293.
- Zhang S., Funahashi Y., Tanaka S. et al. *Chlamydia trachomatis* relies on the scavenger role of aryl hydrocarbon receptor with deetyrosinated tubulin for its intracellular growth, but this is impaired by excess indole // Microbes and Infect. 2023. P. 105097.

Ectopic Expression of Human, Mouse, and Fruit Fly Aryl Hydrocarbon Receptor in *Drosophila melanogaster* Tissues

D. Yu. Baranova¹, A. A. Akishina², R. O. Cherezov², D. A. Kulikova², I. B. Mertsalov², O. B. Simonova², and J. E. Vorontsova^{2, *}

¹*Institute of Biology and Chemistry Moscow Pedagogical State University, Moscow, 119992 Russia*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: vorontsova@idbras.ru*

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor and its target genes play a fundamental role in detoxification, regulation of developmental processes, maintenance of homeostasis, as well as in the occurrence of oncological and autoimmune diseases and drug metabolism. The high conservatism of vertebrate AHR allowed us to study its functions *in vivo* using transformed *Drosophila melanogaster* fruit flies with human or mouse *AHR* gene and compare the ectopic effect of their expression with the expression of *spineless* gene, *Drosophila* AHR homologue. This work demonstrates for the first time that vertebrate AHR exhibits its functional activity in *Drosophila* embryogenesis, in leg imaginal discs and in somatic cells of female reproductive system in the absence of exogenous ligands.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor AHR, spineless, ectopic expression, ligand, *Drosophila melanogaster*

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.852'1

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНА ПОЛОВОЙ ПЛАЗМЫ *germes* СРЕДИ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

© 2023 г. В. В. Кондукторова^а, *, Е. Г. Фофанова^б, Д. А. Никишин^{а, б}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119992 Россия

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: virgo584@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 25.08.2023 г.

Ген *germes* — маркер половой плазмы и первичных половых клеток (ППК), описанный у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Известно, что гиперэкспрессия его мутантной формы негативно влияет на формирование и миграцию ППК. Однако до сих пор не было известно, насколько широко этот ген представлен у животных разных филогенетических групп. В данной работе был проведен биоинформатический анализ геномных и транскриптомных последовательностей животных, имеющих половую плазму. Оказалось, что гомологи *germes* имеются только у представителей родов *Xenopus* и *Hymenochirus* семейства Pipidae (отряд Anura). Полученные результаты подтверждены путем ОТ-ПЦР-анализа экспрессии ортологов *germes* в яичниках шести представителей разных семейств Anura. Филогенетический анализ клонированных последовательностей гомологов *germes* говорит о появлении этого гена у предков Pipidae и вторичной его утрате в роде *Pseudohymenochirus*. Также показано, что аминокислотные последовательности функциональных доменов белка Germes в значительной степени консервативны.

Ключевые слова: *germes*, половая плазма, ППК, BLAST, бесхвостые амфибии

DOI: 10.31857/S0475145023060058, **EDN:** HXNNDU

ВВЕДЕНИЕ

Предшественники половых клеток у большинства животных закладываются на ранних этапах онтогенеза в результате одного из двух принципиально разных механизмов — индукционного и детерминативного (Extavour, Akam, 2003). У хвостатых амфибий, черепах, ящериц, змей и плацентарных млекопитающих, а также тихоходок, сверчков, пчел, клопов и пауков, первичные половые клетки (ППК), возникают из соматических клеток эмбриона в результате индукционных воздействий, поступающих от окружающих эмбриональных тканей (Hansen et al., 2021). Для бесхвостых амфибий, костистых рыб, крокодилов и птиц, а также ос, тлей, плодовых мушек, асцидий, морских стрелок и нематод механизм детерминации ППК связан с наследованием клетками определенных цитоплазматических детерминант материнского происхождения, сконцентрированных в специфической безмембранной структуре, называемой половой плазмой (germ plasm) (Hansen et al., 2021). Половая плазма формируется во время оогенеза в определенной зоне цитоплазмы ооцита, в которой агрегируются митохондрии, эндоплазматический ретикулум, электронноплотные гра-

нулы, а также специфический набор матричных и некодирующих РНК и белков (Houston, King, 2000).

Состав и функции молекулярных компонентов половой плазмы детально изучены на модельных организмах, использующих детерминативный механизм спецификации ППК — амфибии *Xenopus laevis*, насекомом *Drosophila melanogaster*, нематоде *Caenorhabditis elegans* и костистой рыбе *Danio rerio* (Castrillon et al., 2000; Rengaraj et al., 2010; Julaton et al., 2011). Набор генов-маркеров половой плазмы включает гены *ddx4* (*vasa*), *dazl*, *nanos*, *pum*, *smB/smD*. Он довольно консервативен и характерен также для ППК животных с индукционным механизмом их формирования, в том числе млекопитающих (Castrillon et al., 2000; Lesch, Rengaraj et al., 2010; Julaton et al., 2011; Page, 2012). Продукты этих генов являются РНК-связывающими факторами, которые регулируют локализацию и трансляцию других мРНК, и необходимы для формирования и спецификации ППК (Lesch, Page, 2012).

Germes является компонентом половой плазмы и впервые описан у *X. laevis* (Berekelya et al., 2003). РНК *germes* визуализируется в ооцитах в составе половой плазмы (Berekelya et al., 2003), а белок Germes детектируется в мигрирующих ППК

перед заселением в гонаду (Konduktorova et al., 2022). Последовательность белка Germes содержит два мотива лейциновых застежек-молний (*Leucine zippers*, LZ) и кальций-связывающий EF-hand домен (Berekelya et al., 2007). Оверэкспрессия мРНК мутантной формы Germes, лишенной LZ доменов, приводит к аномальной морфологии ППК и негативно влияет на их количество и способность к миграции (Berekelya et al., 2007). Среди белковых партнеров Germes — легкие цепи динеина *dlc8a* и *dlc8b* (Berekelya et al., 2007), посредством которых, возможно, собираются белковые комплексы или происходит взаимодействие с цитоскелетным “молекулярным мотором” динеином (King, 2000; Rapali et al., 2011). Таким образом, Germes является важным компонентом половой плазмы и обеспечивает правильное формирование и функционирование ППК у *X. laevis*. Возникает вопрос, насколько широко гомологи данного гена распространены среди животных и насколько консервативна их функциональная роль в формировании ППК? Для ответа на этот вопрос, с помощью методов биоинформатики было исследовано наличие гомологов гена *germes* у животных, обладающих половой плазмой. Также был выполнен ОТ-ПЦР-анализ экспрессии ортологов *germes* в яичниках шести представителей разных семейств Ануга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Работа проводилась на самках бесхвостых амфибий следующих видов: *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), *Hymenochirus boettgeri* (Tornier, 1896), *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758), *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761). *X. laevis* является лабораторным видом и содержится на кафедре эмбриологии МГУ, остальные лягушки были приобретены в зоомагазине и определены до вида по ключу (Terent'ev, Chernov, 1965). Тотальная РНК из правого и левого яичника каждой амфибии выделялась независимо. *R. temporaria* и *B. bufo* были взяты по две каждой особи, а *H. boettgeri* и *B. bombina* — по пять. Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Выделение РНК и синтез кДНК

Тотальную РНК яичников выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Evrogen, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество тотальной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). кДНК синтезировали из 1–2 мкг тотальной РНК с помощью набора М-MLV (Evrogen, Россия).

Молекулярное клонирование и анализ последовательностей

С использованием полученных кДНК в качестве матрицы, проведена ПЦР с вырожденными олигонуклеотидами, специфичными для наиболее консервативного участка последовательностей *germes* *X. laevis* (GenBank ID: AY172320.1) и *X. tropicalis* (GenBank ID: XM_031898981.1). Последовательности вырожденных праймеров: 5'-TTGGGATAGTTATGACCTTC-3' и 5'-TCCTCCTCCTTAAGTATGGCT-3'. Полученный ампликон клонировали в вектор pGEMT (Promega, США) или pAL-TA (Evrogen, Россия) для последующего секвенирования.

Поиск нуклеотидных последовательностей транскриптов и белков проводили в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Последовательности сравнивали и выравнивали с помощью программы NCBI BLAST 2 с использованием алгоритма discontinuous megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Stephen et al., 1997) и Clustal Omega 3 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Секвенированные последовательности полученных ампликонов сравнивали с нуклеотидными и белковыми последовательностями *X. laevis* в NCBI BLAST.

Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено вручную на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе amphibiaweb.org (https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html). Для построения дерева использовались лишь виды, геномы которых доступны в базе NCBI и были проанализированы на наличие *germes*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки наличия гомологов гена *germes* у животных, обладающих половой плазмой, мы провели широкий поиск в базе данных NCBI с помощью алгоритма BLAST. BLAST-поиск ортологов гена *germes* в базе данных аннотированных нуклеотидных последовательностей Nucleotide, выявил только одну предсказанную последовательность. Это последовательность XM_031898982.1 мРНК *Xenopus tropicalis* (Gray, 1864), обладающая со значительной степенью гомологии (79%). В связи с тем, что последовательности, гомологичные *germes*, не были найдены ни у хвостатых амфибий, ни у представителей других групп животных, мы сосредоточили дальнейшие усилия на поиске гомологов *germes* у бесхвостых амфибий.

На следующем этапе мы искали последовательности, гомологичные гену *germes*, в геномных последовательностях представителей Ануга, доступных в базе данных NCBI. У другой амфибии рода *Xenopus*, *Xenopus borealis* (Parker, 1936), была выявлена последовательность гена (CM044435), гомологичная последовательности *germes* *X. laevis*. Нам удалось собрать полную кодирующую после-

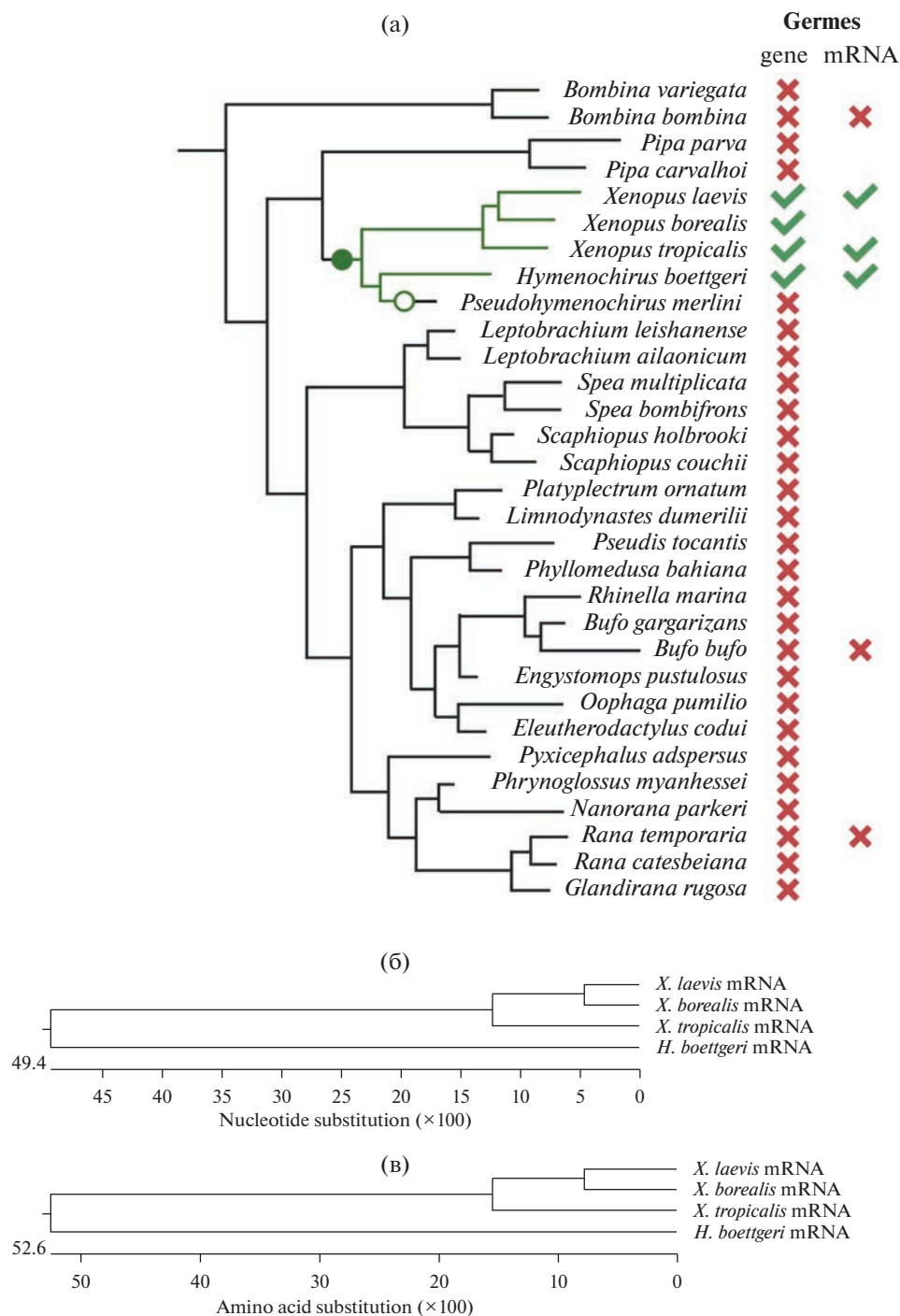


Рис. 1. (а) Распределение ортологов гена *germes* на филогенетическом дереве Анура. Виды, для которых был найден ген *germes* и его гомологи, отмечены зеленым цветом. Узлы, в которых предположительно появляется и исчезает этот ген, отмечены закрашенным и пустым кругом, соответственно. Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе [amphibiaweb.org](https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html) (https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html). (б, в) Анализ гомологии последовательностей ортологов гена *germes*. Филогенетическое дерево мРНК (б) и аминокислотных последовательностей (в).

довательность транскрипта *X. borealis* и соответствующего белка. Анализ выравнивания полученных последовательностей показал, что идентичность нуклеотидных последовательностей между *X. laevis*

и *X. borealis* выше, чем между *X. laevis* и *X. tropicalis* (88 и 79% соответственно). Это объясняется тем, что *X. laevis* и *X. borealis* филогенетически ближе друг к другу (рис. 1а).

Помимо представителей рода *Xenopus*, гомолог *germes* был найден только в геноме малой когтистой лягушки *Hymenochirus boettgeri*, которая принадлежит к семейству Pipidae, как и представители рода *Xenopus*. Идентичность нуклеотидной последовательности *germes H. boettgeri* по сравнению с *X. laevis* составляет 74%. При этом гомологи *germes* не были обнаружены в геномах представителей других родов Pipidae, *Pipa* и *Pseudohymenochirus*, а также других семейств бесхвостых амфибий (рис. 1а).

Для верификации полученных результатов, был проведен ПЦР-анализ экспрессии ортологов *germes* в тканях яичников представителей нескольких семейств Anura. Используя праймеры, разработанные для короткого консервативного участка мРНК *germes X. laevis* (150 п.н.), который полностью комплементарен последовательности *germes X. tropicalis*, была выполнена ОТ-ПЦР с образцами яичников шести представителей Anura. Таким образом, были амплифицированы, клонированы и секвенированы частичные последовательности гомологов *germes* не только *X. laevis* и *X. tropicalis*, но и *H. boettgeri*. Анализ полученного фрагмента подтвердил высокую гомологию нуклеотидных последовательностей *germes X. laevis* и *H. boettgeri* (78%) (рис. 1б). ПЦР-анализ экспрессии гомологов *germes* в яичнике *Rana temporaria*, *Bufo bufo* и *Bombina bombina* не выявил гомологичных последовательностей, что согласуется с результатами биоинформатического анализа.

Согласно нашим результатам, *germes* встречается только в семействе Pipidae. К семейству Pipidae относятся южноамериканский род *Pipa* и три африканских рода — *Xenopus*, *Hymenochirus* и *Pseudohymenochirus* (Frost, 2023). Гомолог гена и транскрипт *germes* были обнаружены только у видов, принадлежащих к родам *Xenopus* и *Hymenochirus* (рис. 1а). Множественный анализ частичной или полной последовательности белка Germes у четырех видов амфибий (рис. 1в) показал, что самая высокая гомология наблюдается между *X. laevis* и *X. borealis*. Более низкий уровень гомологии данной последовательности наблюдается у *X. tropicalis*, а гомолог *germes H. boettgeri* имеет наименьший уровень гомологии среди четырех видов. Полученные данные об уровне гомологии последовательности *germes* полностью соответствуют представлениям о филогении этой группы. По всей вероятности, этот ген возник в пределах семейства Pipidae (рис. 1а), а позднее был утрачен в одной из линий, к которой относится род *Pseudohymenochirus*.

Таким образом, ген половой плазмы *germes* имеется только у представителей родов *Xenopus* и *Hymenochirus* в пределах одного семейства Pipidae бесхвостых амфибий. При этом, как показано в экспериментах на шпорцевой лягушке, он не только является маркером половой плазмы, но и необходим для поддержания правильного фор-

мирования и миграции ППК (Berekelya et al., 2003; Konduktorova et al., 2022). Анализ аминокислотных последовательностей, кодируемых выявленными гомологами *germes* показал, что LZ домены, ответственные за взаимодействие с другими белками, являются консервативными структурами. Это говорит в пользу того, что у представителей Anura, имеющих *germes*, он выполняет сходные функции в половой плазме и ППК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Наталье Николаевне Лучинской за помощь в обращении с различными видами амфибий и ценные рекомендации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа Д.А. Никишина и Е.Г. Фофановой поддержана Государственным заданием № 0088-2021-0009.

Исследование В.В. Кондукторовой поддержано проектом ГУ № 30-2-21.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания и эвтаназии соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.В. Кондукторова выполнила большую часть экспериментов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Berekelya L.A., Ponomarev M.B., Luchinskaya N.N. et al. *Xenopus* *germes* encodes novel germ plasm-associated transcript // Gene Expression Patterns. 2003. V. 3. P. 521–524.
- Berekelya L.A., Mikryukov A.A., Luchinskaya N.N. et al. The protein encoded by the germ plasm RNA Germes associates with dynein light chains and functions in *Xenopus* germline development // Differentiation. 2007. V. 75. P. 546–558.
- Castrillon D.H., Quade B.J., Wang T.Y. et al. The human VASA gene is specifically 1 expressed in the germ cell lineage // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. V. 97. P. 9585–9590.

- Extavour C.G., Akam M.* Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation // *Development*. 2003. V. 30(24). P. 5869–5884.
- Frost D.R.* Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access) // Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. 2023. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Hansen C.L., Pelegri F.* Primordial germ cell specification in Vertebrate embryos: phylogenetic distribution and conserved molecular features of preformation and induction // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9. P. 730332.
- Houston D.W., King M.L.* Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate // *Current Topics in Developmental Biology*. 2000. V. 50. P. 155–181.
- Julaton V.T.A., Reijo Pera R.A.* NANOS3 function in human germ cell development // *Human Molecular Genetics*. 2011. V. 20. P. 2238–2250.
- King S.M.* The dynein microtubule motor // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000. V. 1496. P. 60–75.
- Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N., Belyavsky A.V.* Expression of the *germes* germ plasm gene in follicular cells of *X. laevis* oocytes // *Russian J. Dev. Bio.* 2022. V. 53. P. 350–362.
- Lesch B.J., Page D.C.* Genetics of germ cell development // *Nature Reviews Genetics*. 2012. V. 13. P. 781–794.
- Rapali P., Garcia-Mayoral M.F., Martinez-Moreno M. et al.* LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011. V. 414. P. 493–498.
- Rengaraj D., Zheng Y.H., Kang K.S. et al.* Conserved expression pattern of chicken DAZL in primordial germ cells and germ-line cells // *Theriogenology*. 2010. V. 74. P. 765–776.
- Stephen F.A., Madden T.L., Schäffer A.A. et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Terent'ev P.V., Chernov S.A.* Key to Amphibians and Reptiles (3rd ed.) // Israel Program for Scientific Translations. 1965.

The Distribution of the Germ Plasm Gene *germes* among Anurans

V. V. Konduktorova^{1, *}, E. G. Fofanova², and D. A. Nikishin^{1, 2}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

²Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: virgo584@yandex.ru

The *germes* gene is a marker of germ plasm and primordial germ cells (PGC) described in the African clawed frog *Xenopus laevis*. It is known that overexpression of its mutant form negatively affects the formation and migration of PGC. However, until now it was not known how widely this gene is represented in animals of different phylogenetic groups. In this work, we performed bioinformatic analysis of genomic and transcriptome sequences of animals with germ plasm. It turned out that *germes* homologs are present only in representatives of the genera *Xenopus* and *Hymenochirus* of the family Pipidae (order Anura). The obtained results were confirmed by RT-PCR analysis of the expression of *germes* orthologs in the ovaries of six representatives of different Anura families. Phylogenetic analysis of cloned sequences of *germes* homologs suggests the appearance of this gene in the ancestors of Pipidae and its secondary loss in the genus *Pseudohymenochirus*. It is also identified that the amino acid sequences of the functional domains of the *Germe*s protein are rather conservative.

Keywords: *germes*, germ plasm, PGC, BLAST, anurans

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ ИЗМЕНЯЕТ НАПРАВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК ЧЕЛОВЕКА С ФОРМИРОВАНИЕМ КАРДИОСФЕР ВМЕСТО КОЖНЫХ ОРГАНОИДОВ

© 2023 г. В. К. Абдыев^{а, *}, А. А. Рябинин^{а, **}, Е. Д. Ерофеева^б,
М. Д. Панкратова^{а, б}, Е. А. Воротеляк^а, А. В. Васильев^{а, б}

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Ленинские горы 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*e-mail: mailto:vepa@gmail.com

**e-mail: andrey951233@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 09.10.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) являются уникальным типом клеток, способным дифференцироваться во все типы клеток организма. В культуре ПСК могут существовать субпопуляции с различным уровнем плюрипотентности, что приводит к различным результатам при их дифференцировке. Одним из ключевых факторов, определяющих состояния плюрипотентности и влияющих на потенциал дифференцировки ПСК, является эпигенетическое состояние клеток, в том числе уровень деацетилирования гистонов. Активация деацетилазы гистонов (HDAC) в ПСК человека и мыши увеличивает процентное содержание гетерохроматина. В данной работе мы использовали протокол дифференцировки эмбрионидных телец из индуцированных плюрипотентных клеток человека (чИПСК), рассчитанный на формирование эктодермы и нейроэктодермы с последующим их развитием в кожные органоиды. Однако после воздействия на чИПСК ингибиторов HDAC (бутирата натрия и вальпроовой кислоты), направление их дифференцировки менялось: формировалась мезодерма, которая в дальнейшем развивалась в сокращающиеся кардиосферы.

Ключевые слова: чИПСК, направленная дифференцировка, HDAC, кожный органоид, эктодерма, нейроэктодерма, HDACi, кардиосферы

DOI: 10.31857/S0475145023060022, **EDN:** HKRZYI

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и способны дифференцироваться в три зародышевых листка. По источнику происхождения выделяют два типа ПСК: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). В ходе эмбрионального развития происходит изменение эпигенетического состояния клеток. В ПСК увеличивается процентное содержание гетерохроматина за счет активности деацетилазы гистонов (HDAC), которая удаляет ацетильные группы с гистонов и стимулирует компактизацию хроматина (Johnstone, 2002; Saraiva et al., 2010). Было показано, что ингибирование HDAC способствует гиперацетилированию гистонов (Seto, Yoshida, 2014), что приводит к переходу гетерохроматина в эухроматин и способствует увеличению доступности промоторов и энхансеров.

Кроме того, известно, что в культуре ПСК могут существовать субпопуляции, различающиеся потенциалом к дифференцировке и профилем экспрессии генов. В связи с этим, представляет интерес разработка способов модуляции экспрессии генов с помощью воздействия на ацетилирование гистонов.

В рамках данного исследования мы наблюдали воздействие ингибиторов HDAC (HDACi) на чИПСК, культивировавшиеся в соответствии с протоколом, который ранее применялся для получения кожных органоидов (Lee et al., 2020, 2021). В результате такого воздействия изменялась траектория дифференцировки этих клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование линии чИПСК

В работе использовалась линия чИПСК (hiPSC-KYOU-DXR0109B [201B7] (ANCC ACS-1023)).

Клетки культивировали в условиях нормоксии (5% CO₂ и 20% O₂) в среде Essential 8 (Thermo Fisher Scientific, США). Замену среды осуществляли каждый день. По достижении 60–80% конfluence, клетки пассировали с помощью аккутазы (1 мг/мл) (STEMCELL Technologies, Канада). Для получения ЧИПСК человека, обработанных HDACi, стандартную среду заменяли на среду mTeSR1 с добавлением HDACi (с VPA и бутиратом натрия) (0.5× mTeSR1 (Stemcell, США), 0.5× Neurobasal™ medium (Gibco, США), 0.5% Glutamax (Gibco), 0.5% Пенициллин/стрептомицин (Gibco, США) 0.5% N2 (Gibco, США), 1% B27 (Gibco, США), 0.5% NEAA (Gibco, США), 50 нМ вальпроевая кислота (VPA) (Sigma, США), 0.1 мМ бутират натрия (NaB) (Stem cells, США), 0.05 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma, США), 25 мкг/мл бычий сывороточный альбумин (BCA) (Sigma, США). Замена среды осуществлялась каждый день.

Получение и дифференцировка кожных органоидов

Формирование эмбрионидных телец. Формирование эмбрионидных телец осуществлялось в соответствии с описанным ранее протоколом (Lee et al., 2020), за исключением того, что в среду не вносили нормоцин.

Дифференцировка органоидов. Для дифференцировки эмбрионидных телец и созревания органоидов использовали ранее опубликованный протокол (Lee et al., 2020). На стадии созревания вместо низкоадгезивных планшетов были использованы обычные планшеты для адгезивных культур (Corning, США), покрытые 1% агарозой (Sigma). Помимо этого, в среды для дифференцировки и созревания не вносили нормоцин. В эксперименте для проведения дифференцировки эмбрионидных телец в контрольных условиях (эмбрионидные тельца, полученные из ЧИПСК, культивируемых на E8 в условиях нормоксии) и в модифицированных условиях (эмбрионидные тельца, полученные из ЧИПСК, культивируемых на модифицированной среде на базе mTeSR1 с добавлением HDACi) использовали по 10 органоидов.

Иммуноцитохимическое маркирование

Перед фиксацией культуру клеток трижды промывали раствором PBS (ПанЭко, Россия), далее клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течение 60 мин при 4°C. После фиксации клетки трижды промывали раствором PBS по 3–5 мин. Далее производили пермеабиллизацию с помощью 0.2% раствора Triton X-100 (Sigma) в PBS в течение 15 мин. Затем клетки дважды промывали PBS в течение 10–15 мин. Для блокировки неспецифической сорбции антител клетки предварительно инкубировали 60 мин при 37°C в блокирующем растворе (5% FBS (Hyclone, США); 0.3% Triton (Sigma); 0.01% Tween (Sigma)). Далее удаляли блокирующий

раствор и добавляли первичные антитела к белкам, специфичным для ЧИПСК, растворенные в блокирующем растворе, содержащем PBS и 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma). Использовали концентрации первичных антител, соответствующие рекомендациям производителя, инкубацию в них производили при 4°C в течение ночи. После инкубации клетки трижды промывали раствором PBS. Вторичные антитела использовали в разведении 1 : 1000. Далее клетки инкубировали во вторичных антителах 90 мин при 37°C. Далее клетки трижды отмывали раствором PBS. Ядра клеток в течение 5 мин окрашивали DAPI (VitroVivo biotech, США) в конечной концентрации 0.1 мкг/мл. Клетки визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе EVOS FL AUTO (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения обрабатывали в программе ImageJ (<https://imagej.net/>). Список первичных антител: OCT4 (Abcam ab181557, 1 : 250); KLF17 (Santa Cruz sc-398132, 1 : 200, США). Список вторичных антител: Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG (H+L) (Invitrogen A-21201, 1 : 1000, США); Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L) (Invitrogen A-21441, 1 : 1000).

Получение криосрезов и иммуногистохимическое маркирование кожных органоидов

Для иммуноокрашивания органоиды трижды отмывали от среды раствором PBS (ПанЭко, Россия), далее фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma) в течение 30 мин при комнатной температуре. После фиксации органоиды трижды промывали PBS (ПанЭко, Россия) по 5 мин, и затем проводили через 15 и 30% растворы сахарозы (Helicon, Россия). Далее органоиды погружали в коммерческую среду для замораживания тканей Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Япония) и замораживали в жидком азоте. Криосрезы органоидов толщиной 10 мкм изготавливали на криостате Leica SM1900. Первичные антитела наносили на срезы в блокирующем растворе (0.5% FBS; 0.2% Tween 20; 0.2% Triton X-100) в разведениях, соответствующих рекомендациям производителя. Инкубация с первичными антителами проходила при 4°C в течение 24 ч. После инкубации срезы трижды промывали раствором PBS. Затем на срезы наносили раствор фаллоидина (Alexa Fluor 488, A12379, Thermo Fisher, США) для визуализации F-актина, а также раствор вторичных антител в разведении 1 : 500 и инкубировали при 4°C в течение 60 мин в темноте. Далее срезы трижды отмывали от вторичных антител и фаллоидина раствором PBS. Для визуализации ядер клеток проводили окрашивание ДНК-связывающим красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин. Срезы заключали в среду Aqueous Mounting Medium (Abcam, Великобритания) и визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus IX73 с камерой

Olympus DP74. Изображения обрабатывали в программе ImageJ (<https://imagej.net/>). Список первичных антител: N-кадгерин (Abcam ab18203, 1 : 1000); Eomes (Abcam ab183991, 1 : 2000), Vimentin (Abcam ab24525, 1 : 5000), Cytokeratin 14 (Abcam ab181595, 1 : 500); AE 13 (K40) (Invitrogen MA1-5765, 1 : 300); Desmin (R&D Systems AF3844, 1 : 650). Список вторичных антител: Alexa Fluor 546 Donkey-anti-rabbit (Invitrogen A10040 (1 : 500)); Alexa Fluor 594 Goat-anti-chicken (Invitrogen A11042, 1 : 500); Alexa Fluor 660 goat-anti-mouse (Invitrogen A21055, 1 : 500), Alexa Fluor 546 donkey-anti-goat (Invitrogen A11056, 1 : 500).

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Выделение РНК из клеточных культур осуществляли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Реагент добавляли в суспензию клеток в объеме 1 мл из расчета 1×10^6 – 10^7 клеток и оставляли при комнатной температуре 10–15 мин. Далее смесь центрифугировали 10 мин при 12000 g, а супернатант переливали в новую пробирку. В пробирку с супернатантом добавляли 0.2 мл хлороформа и встряхивали ее в течение 15 с. Далее образец инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Образец центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. Далее из пробирки отбирали водную фазу, добавляли в нее 0.5 мл 100% изопропанола (Sigma) и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Из пробирки отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне, и по стенке добавляли 2 мл 75% этанола. Далее образец центрифугировали на 15000 g в течение 5 мин при комнатной температуре, удаляли этанол, высушивали осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5–7 мин. Осадок растворяли в 20 мкл воды, свободной от РНКаз, прогревая образцы 3–5 мин при 55–60°C. Концентрацию выделенной РНК определяли на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили с использованием MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. Для осуществления реакции готовили две смеси. Первая смесь в объеме 9 мкл содержала 1 мкг РНК-матрицы, 20 мкМ праймеров, 1 мкл ингибитора РНКаз и деионизированную, свободную от нуклеаз воду (Евроген). Смесь перемешивали пипетированием и прогревали 2 мин при 70°C для денатурации вторичных структур РНК и переносили образцы в лед. Состав второй смеси в объеме 11 мкл включал: деионизированную воду, свободную от нуклеаз; 4 мкл 5× буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ),

1 мкл MMLV ревертазы. Обе смеси смешивали и инкубировали 60 мин при 42°C. Для остановки реакции итоговую смесь прогревали при 70°C в течение 10 мин. Образцы хранили при –20°C, заранее разделив на аликвоты. Перед применением аликвоту прогревали 2 мин при 65°C для дезагрегации молекул кДНК. После обратной транскрипции для проведения реакции ПЦР-РВ кДНК разводили в 10 раз.

Подбор праймеров

Праймеры были подобраны в онлайн ресурсе Primer-BLAST, интегрированном в базу данных NCBI (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Дополнительную проверку праймеров проводили в программах Primer Select и Oligo Analyzer. Температуру отжига праймеров определяли с помощью программы Oligo или опытным путем. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

ПЦР, ПЦР-РВ

Качественную и количественную оценки экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ПЦР и ПЦР-РВ. ПЦР проводили на матрице, ранее синтезированной кДНК с помощью набора Screenmix (Евроген, Россия) для амплификации в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе T1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, США).

Для ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовали кДНК (синтезирована из 1 мкг тотальной РНК) и готовую смесь для ПЦР qPCR mix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия). Относительный уровень экспрессии генов интересов определяли с помощью калибровочной кривой и нормализовали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Исследование проводилось в трех технических и трех независимых экспериментальных повторях. Реакции проводились на приборе LightCycler 96 System (Roche, Швейцария). Для сравнения экспрессии генов в различных условиях использовался сравнительный СТ-метод для относительного количественного анализа. По полученным значениям СТ рассчитывался $\Delta\Delta CT$ для оценки различий в экспрессии генов.

Проверка статистической значимости различий в уровнях экспрессии исследуемых генов осуществлялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа, проведенного в приложении MS Excel (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика чИПСК в контрольных и модифицированных условиях

Эффект воздействия HDACi на вектор трехмерной дифференцировки чИПСК ранее не был

Таблица 1. Праймеры, использованные при проведении ПЦР-РВ

Название праймера	Последовательность (5'–3')
DAZL-forward	ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA
DAZL-reverse	CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA
GAPDH-forward	CACCCACTCCTCCACCTTGAC
GAPDH-reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG
KLF2-forward	CAAGAGTTCGCATCTGAAGGC
KLF2-reverse	AGAAGGCACGATCGCACAG
KLF4-forward	ACCAGGCACTACCGTAAACACA
KLF4-reverse	GGTCCGACCTGGAAAATGCT
KLF17-forward	TAGACCCACCCAGTCTTCAT
KLF17-reverse	CGCTGAGTTCTCGTTATCCTGGG
NANOG-forward	CAATGGTGTGACGCAGGGAT
NANOG-reverse	TGCACCAGGTCTGAGTGTTT
OCT4/Pou5f1-forward	ACCCACACTGCAGCAGATCA
OCT4/Pou5f1-reverse	CACACTCGGACCACATCCTTCT
PRDM14-forward	AAGCAACTGGATGCGCTATGT
PRDM14-reverse	GGGATGGGCTTAATGGTGTAGAA
REX1-forward	GCCTTATGTGATGGCTATGTGT
REX1-reverse	ACCCCTTATGACGCATTCTATGT
SOX2-forward	TGCGAGCGCTGCACAT
SOX2-reverse	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
STAT3-forward	CGGAGAAACAGGATGGCCC
STAT3-reverse	GCGGCTATACTGCTGGTCAA
STELLA/DPPA3-forward	AGAGAAGGGTCCGCACTTTG
STELLA DPPA3-reverse	TTCCCGATTTTCGCATTCTC
TFE3-forward	AGCCATCACTGTCAGCAACT
TFE3-reverse	TGTCTTTCTTCTGCCGTTCTT
YAP-forward	TCCCAGATGAACGTCACAGC
YAP-reverse	GAAGAGGACTGAAGCCGAG

описан. Мы изучали этот эффект на модели дифференцировки эмбрионидных телец в кожные органоиды (Lee et al., 2020). Для этого перед формированием эмбрионидных телец мы культивировали чИПСК в 2 разных условиях: контрольных, в среде E8, где чИПСК поддерживаются в так называемом праймированном состоянии и компетентны к дифференцировке (Teslaa et al., 2016), а также в экспериментальных, в среде с bFGF, бутиратом натрия и вальпроевой кислотой, где клетки поддерживаются в модифицированном, менее праймированном состоянии (см. Материалы и методы). В результате сравнительного анализа этих состояний не было обнаружено отличий в морфологии чИПСК, обработанных HDACi, относительно контрольных чИПСК (рис. 1а, 1б). Однако в присутствии HDACi уровень экспрессии генов *KLF2*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG* увеличивался (рис. 1в). Мы также зафиксировали значительное повышение уровня экспрессии *DAZL* в контроле относительно экспериментальной группы. Кроме того, в среде с HDACi, наблюдали повышение экспрессии генов-маркеров более раннего (наивного) состояния плюрипотентности (*KLF2*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*), что свидетель-

ствуют о сохранении плюрипотентного статуса чИПСК в среде с HDACi одновременно с их сдвигом в раннее состояние плюрипотентности.

Сравнительный анализ

дифференцировки эмбрионидных телец и органоидов в контрольной и экспериментальной группах

Эмбрионидные тельца (ЭТ) были сформированы из контрольных чИПСК и чИПСК, обработанных HDACi. Метод формирования был взят из статьи, описывающей формирование кожного органоида из чИПСК (Lee et al., 2020). Сформированные ЭТ на начальной стадии содержали по 3000 клеток. В контрольных условиях у ЭТ дифференцировались покровная эктодерма и нейроэктодерма. Впоследствии покровная эктодерма формировала цисту, выстланную эпидермисом, а нейроэктодерма формировала соединительную ткань, что было подтверждено иммуногистохимическим маркированием K14 и виментина на 30й день дифференцировки эмбрионидных телец (рис. 2а). На 110й день дифференцировки в органоидах сформировались волосные фолликулы, что подтверждается экспрессией AE13, маркера стержня волоса (рис. 2а). Эти результаты согласуют-

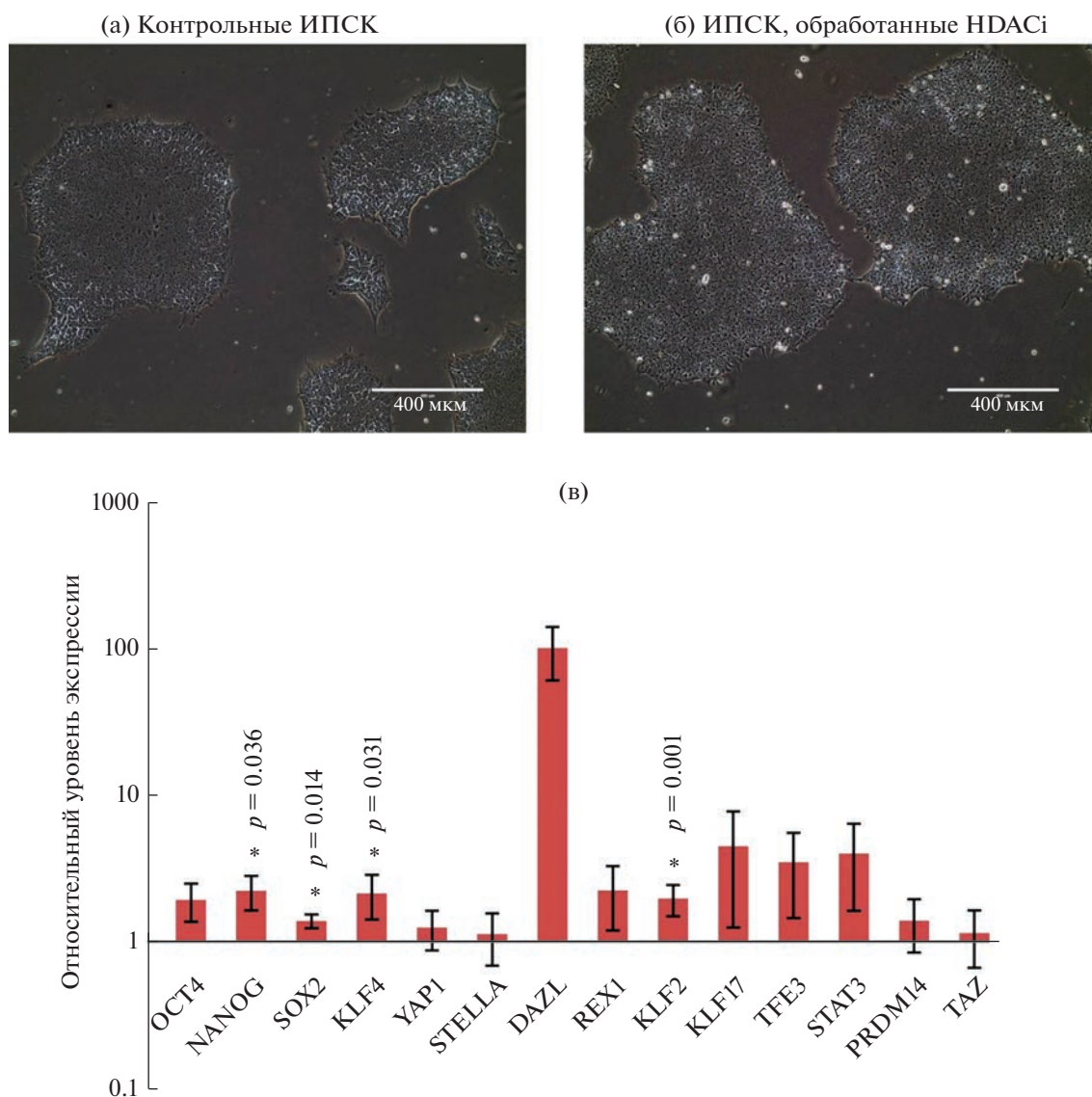


Рис. 1. Морфология колоний чИПСК и экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в чИПСК. (а) Морфология колоний контрольных чИПСК. Фазово-контрастная микроскопия, пятые сутки культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (б) Морфология колоний чИПСК в среде с добавлением HDACi. Фазово-контрастная микроскопия, пятые сутки культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (в) Экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в чИПСК. Сравнение профилей экспрессии маркерных генов в чИПСК после воздействия HDACi и в контроле. Данные представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего. По оси ординат — относительный уровень экспрессии генов, нормированных на экспрессию гена домашнего хозяйства, *GAPDH*, и на экспрессию генов в контрольной группе (логарифмическая шкала, $\log_{10}$ -(значение)). * — Статистическая достоверность результатов однок факторного дисперсионного анализа на уровне $p < 0.05$.

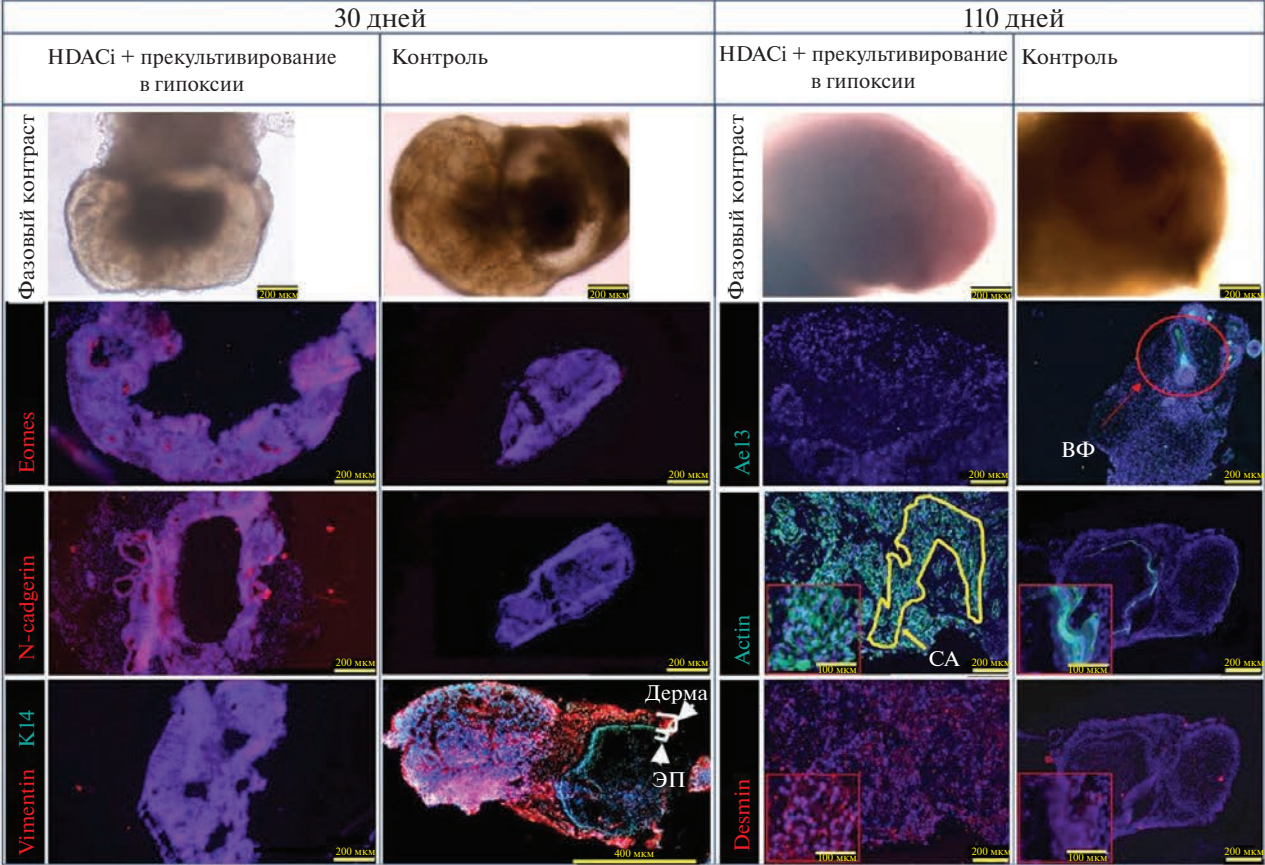
ся с литературными данными, описывающими формирование кожных органоидов в ходе дифференцировки ЭТ (Lee et al., 2020). В то же время, в органоидах, полученных из чИПСК, обработанных HDACi, не были выявлены K14 и виментин. Однако, в отличие от контроля, в этих органоидах были идентифицированы ранние маркеры мезодермальной дифференцировки — EOMES и N-кадгерин. На 110й день маркеры волосяных фолликулов в органоидах выявлены не были. Однако результаты выявления актина и десмина демонстрируют, что цитоплазматические паттерны этих белков различаются в контроле и в

эксперименте, при использовании модифицированного протокола. Актин-десмин положительные клетки в экспериментальной группе формируют структуры, напоминающие сеть (рис. 2а).

Также с 80-го дня дифференцировки в органоидах экспериментальной группы были зафиксированы ритмичные сокращения с периодом 1 секунда (рис. 2б). Этот признак характерен для кардиоваскулярных органоидов.

Все описанные выше паттерны экспрессии, а также наличие сокращений наблюдались у органои-

(a)



(б)

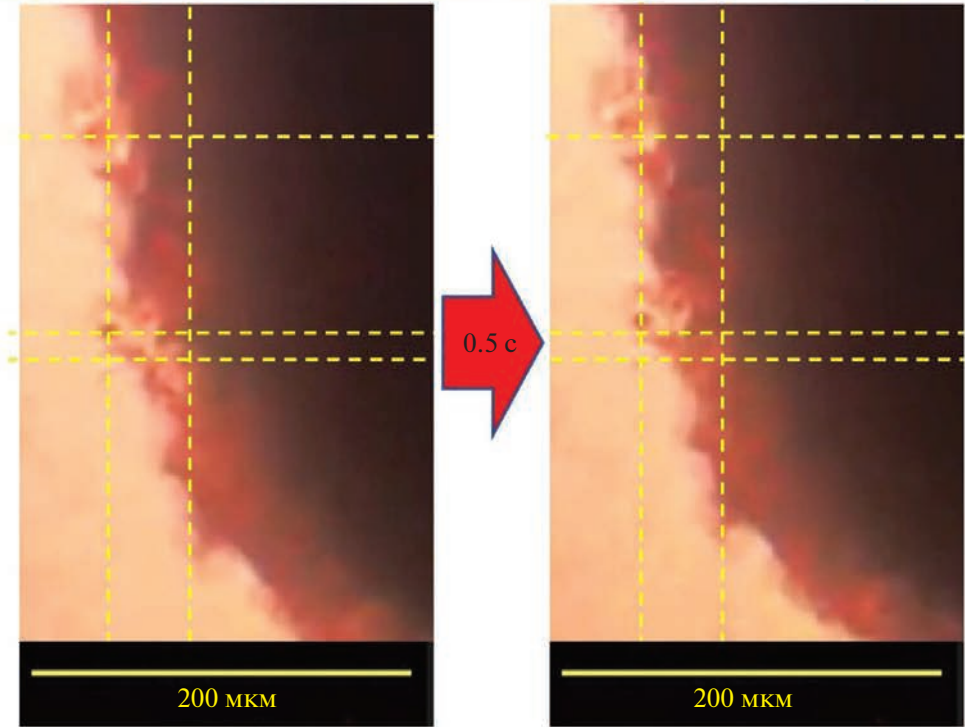


Рис. 2. Результаты иммуногистохимического анализа дифференцировки эмбрионидных телец и детекция сокращения органоидов. (а) Сравнительный иммуногистохимический анализ дифференцировки эмбрионидных телец в кожные органоиды в контроле и в эксперименте. Сверху: эмбрионидные тельца на стадиях 30 и 110 дней дифференцировки, световая микроскопия, фазовый контраст. Масштабный отрезок 200 мкм. Снизу: выявление маркеров мезодермальной дифференцировки (Eomes и N-cadherin), маркеров базальных кератиноцитов (K14) и маркера фибробластов (виментин) на стадии 30 дней дифференцировки; мышечных маркеров (актин и десмин) и маркера стержня волоса волосяного фолликула (AE13) на стадии 110 дней дифференцировки. ЭП — эпителий; ВФ — волосяной фолликул; СА — сеть виментина и K14 (400 мкм) и увеличенных фрагментов изображений (100 мкм). (б) Детекция сокращения органоида, полученного из эмбрионидного тельца, обработанного HDACi. Фазово-контрастная микроскопия, 80 сутки дифференцировки. Масштабный отрезок 200 мкм.

дов, сформированных из чИПСК, обработанных HDACi, в 100% случаев ($N = 10$). У всех изученных органоидов период сокращений составлял около секунды. На основании полученных результатов можно предположить, что в ходе потенциального перехода ПСК в новое эпигенетическое состояние изменился и вектор их дифференцировки. На основании полученных данных можно предположить формирование мезодермы в составе органоидов и, в результате ее дальнейшего развития, кардиомиоцитов. Похожих результатов, то есть получения кардиомиоцитов через стадию мезодермальных клеток в ходе двумерной дифференцировки чИПСК добивались при использовании таких факторов дифференцировки как CHIR99021 (активатор WNT-сигналлинга) и IWP2 (ингибитор WNT-сигналлинга) (Balafkan et al., 2020). Схожие результаты были получены при использовании BMP4 и CHIR99021, но уже при дифференцировке эмбрионидных телец из чИПСК. Также кардиоваскулярные органоиды получали в условиях трехмерной дифференцировки эмбрионидных телец из ПСК мыши под действием неспецифического фактора дифференцировки — фетальной бычьей сыворотки в гидрогеле с заданном модулем эластичности (Shkumatov et al., 2014). Однако данных о получении кардиоваскулярных органоидов по описанному выше протоколу на данный момент нет. Известно, что активация WNT-сигнального пути играет ключевую роль при закладке кардиальной мезодермы в эмбриогенезе (Zhao et al., 2019). Активатор этого пути используется в работах, описывающих получение кардиомиоцитов в ходе дифференцировки чИПСК. Вероятно, в используемом в нашей работе протоколе дифференцировки, активация WNT-пути происходит в результате предварительного воздействия HDACi на чИПСК. Данная гипотеза требует проведения дополнительных исследований, которые мы планируем в ходе дальнейшей работы по данной теме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходный протокол дифференцировки, использованный в данной работе, предполагал формирование из чИПСК эмбрионидных телец, состоящих из нейроэктодермы и покровной эктодермы, с последующим формированием кожных органоидов. Мы предполагаем, что под воздействием

HDACi у чИПСК экспериментальной группы был активирован сигнальный путь WNT. Именно это могло привести к наблюдавшемуся в эксперименте изменению направления индуцированной дифференцировки эмбрионидных телец, полученных из чИПСК. На основании полученных иммуногистохимических данных по трехмерной дифференцировке эмбрионидных телец можно предположить, что чИПСК под воздействием HDACi дифференцировались в мезодермальном направлении с последующим формированием кардиосфер. Помимо этого, под действием HDACi у чИПСК повысились уровни экспрессии маркеров плюрипотентности, которые экспрессируются во внутренней массе клеток бластоцисты человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0088-2021-0016 Института биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова и поддержана Министерством науки и высшего образования, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования клеточных культур человека в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены в соответствии с протоколом комиссии по биоэтике ИБР РАН № 45 от 05.02.2021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев: дизайн исследования. В.К. Абдыев, А.А. Рябинин: составление рукописи, интерпретация данных. В.К. Абдыев, А.А. Рябинин, Е. Ерофеева, М.Д. Панкратова: культивирование чИПСК, получение и дифференцировка эмбрионидных телец, фазово-контрастная микроскопия, выделение РНК, проведение ПЦР в реальном времени, ИГХ анализ, сбор и

анализ данных. Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев: редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Balafkan N., Mostafavi S., Schubert M. et al. A method for differentiating human induced pluripotent stem cells toward functional cardiomyocytes in 96-well microplates // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. 18498. PMID: 33116175; PMCID: PMC7595118.
https://doi.org/10.1038/s41598-020-73656-2
- Brons I., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195.
https://doi.org/10.1038/nature05950
- Fischer B., Meier A., Dehne A. et al. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres // *Stem Cell Res.* 2018. V. 32. P. 65–72. Epub 2018 Aug 24. PMID: 30218895.
https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.08.015
- Johnstone R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer // *Nature*. 2002. V. 1. № 4. P. 287–299.
https://doi.org/10.1038/nrd772
- Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V. et al. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. № 3–4. P. 284–293.
https://doi.org/10.1007/s11626-010-9282-6
- Lau K.X., Mason E.A., Kie J. et al. Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal // *Nature Communications*. 2020. V. 11. № 1. P. 1–18.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-16214-8
- Lee J., Koehler K.R. Skin organoids: A new human model for developmental and translational research // *Exp. Dermatol.* 2021. V. 30. № 4. P. 613–620. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33507537; PMCID: PMC8265774.4).
https://doi.org/10.1111/exd.14292
- Lee J., Rabbani C.C., Gao H. et al. Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells // *Nature*. 2020. V. 582. № 7812. P. 399–404.
- Saraiva N.Z., Oliveira C.S., Garcia J.M. Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation // *World J. Stem. Cells*. 2010. V. 2. № 6. P. 121–126.
https://doi.org/10.4252/WJSC.V2.I6.121
- Seto E., Yoshida M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014. V. 6. № 4. a018713.
https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713
- Shkumatov A., Baek K., Kong H. Matrix rigidity-modulated cardiovascular organoid formation from embryoid bodies // *PLoS One*. 2014. V. 14. № 9. 4 PMID: 24732893; PMCID: PMC3986240.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094764
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024
- Teslaa T., Chaikovskiy A.C., Lipchina I. et al. a-Ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells cell metabolism differentiation of primed human pluripotent stem cells // *Cell Metabolism*. 2016. V. 24. P. 485–493.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.002
- Toyooka Y., Shimosato D., Murakami K. et al. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture // *Development*. 2008. V. 135. № 5. P. 909–918.
https://doi.org/10.1242/DEV.017400
- Zhao M., Tang Y., Zhou Y., Zhang J. Deciphering role of wnt signalling in cardiac mesoderm and cardiomyocyte differentiation from human iPSCs: Four-dimensional control of Wnt pathway for hiPSC-CMs differentiation // *Sci. Rep.* 2019. V. 18. № 9. 1. PMID: 31852937; PMCID: PMC6920374.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-55620-x

Preliminary Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Changes the Direction of Human iPSCs Differentiation with the Formation of Cardiospheres Instead of Skin Organoids

V. K. Abdyevev^{1,*}, A. A. Riabinin^{1,**}, E. D. Erofeeva², M. D. Pankratova^{1,2},
E. A. Vorotelak¹, and A. V. Vasiliev^{1,2}

¹Koltsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: mailto:vepa@gmail.com

**e-mail: andrey951233@mail.ru

Pluripotent stem cells (PSCs) are a unique cell type that can differentiate into all cell types in the body. In PSC culture, subpopulations with different levels of pluripotency may exist, which leads to different results during their differentiation. One of the key factors that determine the state of pluripotency and influence the differentiation potential of PSCs is the epigenetic state of cells, including the level of histone deacetylation. Activation of histone deacetylase (HDAC) in human and mouse PSCs increases the percentage of heterochromatin. In this work, we used a protocol for the differentiation of embryoid bodies from induced human pluripotent hiPSC cells, designed for the formation of ectoderm and neuroectoderm with their subsequent development into skin organoids. However, after hiPSCs were exposed to HDAC inhibitors (sodium butyrate and valproic acid), the direction of their differentiation changed: mesoderm was formed, which subsequently developed into contracting cardiospheres.

Keywords: hiPSCs, directed differentiation, HDAC, skin organoid, ectoderm, neuroectoderm, HDACi, cardiospheres

**КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

**ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК iTAF15Xsk4 ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ
ПАЦИЕНТКИ С МИКРОДЕЛЕЦИЕЙ В Xq24**

© 2023 г. И. Е. Пристяжнюк^a, Н. И. Мещеряков^{a, b}, Т. В. Никитина^c,
А. А. Кашеварова^c, Д. А. Федотов^c, Е. Н. Толмачева^c, Л. И. Минайчева^c,
Л. П. Назаренко^c, И. Н. Лебедев^c, А. Г. Мензоров^{a, b, *}

^aИнститут цитологии и генетики СО РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия

^cНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, Набережная р. Ушайки, 10, Томск, 634050 Россия

*e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.07.2023 г.

После доработки 09.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов и условно здоровых доноров, позволяет изучать генетические аномалии *in vitro*. Ранее мы описали клинический случай привычного невынашивания беременности у пациентки с асимметричной инактивацией X-хромосомы в периферических лимфоцитах, буккальном эпителии и эндометрии. С помощью aCGH мы выявили микроделецию в Xq24 размером 239 т.п.н., затрагивающую восемь генов, включая *UBE2A*. Мы получили линию ИПСК iTAF15Xsk4 из фибробластов кожи пациентки с помощью не интегрирующихся эписомных векторов. Линия ИПСК имела нормальный кариотип, экспрессировала маркеры плюрипотентности и при дифференцировке в эмбрионидные тельца экспрессировала маркеры всех трех зародышевых листков. Полученную линию можно использовать для изучения синдрома дефицита гена *UBE2A*.

Ключевые слова: ИПСК, микроделеция Xq24, синдром дефицита *UBE2A*, привычное невынашивание беременности, асимметричная инактивация X-хромосомы

DOI: 10.31857/S0475145023060071, **EDN:** AGBGZM

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами была описана пациентка с привычным невынашиванием беременности и экстремально асимметричной инактивацией X-хромосомы в периферических лимфоцитах, буккальном эпителии и эндометрии (Tolmacheva et al., 2020). С помощью aCGH мы выявили микроделецию в Xq24 размером 239 т.п.н., затрагивающую восемь генов, включая *UBE2A*.

Генные мутации и делеции гена *UBE2A* могут вызывать редкое генетическое заболевание — синдром Насименто у мужчин, влияющий как на умственное развитие, так и на фенотипические признаки (Nascimento et al., 2006, Thunstrom et al., 2015). Женщины-носительницы делеций, включающих ген *UBE2A*, обычно здоровы, но имеют экстремально смещенную инактивацию X-хро-

мосомы. У пациентов-носителей делеции, помимо серьезной степени умственной отсталости, наблюдаются пороки сердца и мочеполовой системы (Thunstrom et al., 2015). Влияние делеции Xq24 на эмбриолетальность было описано нами в предыдущей работе (Tolmacheva et al., 2020).

Клетки с делециями, включающими ген *UBE2A*, могут быть использованы как для изучения его эффектов при синдроме Насименто, так и, потенциально, механизма инактивации X-хромосомы. В настоящей работе описано получение и характеристика линии ИПСК iTAF15Xsk4, полученной с помощью репрограммирования фибробластов кожи пациентки с микроделецией в Xq24, затрагивающей восемь генов: *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *STEEP1*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPTIN6* и *MIR766*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

Фибробласты были получены от пациентки с микроделецией в Xq24, затрагивающей ген *UBE2A* (Tolmacheva et al., 2020). Фибробласты TAF15 выделяли и культивировали как описано ранее (Nikitina et al., 2018a, 2018b). Для репрограммирования фибробластов использовали электропорацию набором эписомных векторов (по 500 нг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28, mp53DD и EGFP (Okita et al., 2013) с помощью Neon Transfection System с параметрами 1650 В, 10 мс, три импульса (Thermo Fisher Scientific). В течение недели клетки культивировали в среде для фибробластов, затем пересаживали на инактивированные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидер) в среду на основе нокаутного заменителя сыворотки и FGF2 человека (Chechetkina et al., 2022). Колонии ИПСК пересаживали механически с добавлением в день пересадки ингибитора Rho-ассоциированной протеин киназы Y-27632 (Abcam). Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Выделение ДНК и РНК

Геномную ДНК из клеток выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции. Выделение РНК проводили набором Aurum Total RNA mini kit #732-6820 (Bio-Rad) по протоколу производителя.

ПЦР, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ

Детекцию контаминации микоплазмой (Chopra et al., 1998) и присутствия эписом (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/epi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf) в клетках проводили с помощью ПЦР. ПЦР проводили на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-TaQ (2×) (Biolabmix). Для подтверждения плюрипотентности использовали ОТ-ПЦР (Huangfu et al., 2008). Для синтеза кДНК из 0.5 мкг РНК использовали ревертазу М-MuLV (Biolabmix). Для подтверждения делеции использовали ПЦР-РВ на гены *UBE2A* и *SEPTIN6*, локализованные в области делеции, а также на контрольный ген *HEXB* (Tolmacheva et al., 2020). Последовательности праймеров для выявления микоплазмы, эписом, подтверждения делеции, анализа экспрессии генов-маркеров плюрипотентности и дифференцировки в производные трех зародышевых листков приведены в табл. 1.

Кариотипирование

Кариотип клеток анализировали на пассаже 10, используя DAPI-бэндинг (Prokhorovich et al., 2007).

Спонтанная дифференцировка in vitro

Спонтанную дифференцировку ИПСК проводили с помощью спонтанной дифференцировки в эмбрионидные тельца (Bock et al., 2011).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Протокол иммунофлуоресцентного окрашивания был описан ранее (Shnaider et al., 2019). Список антител приведен в табл. 1. Ядра окрашивали с помощью Hoechst 33258. Препараты анализировали на микроскопе LSM 780 NLO (Zeiss) с использованием программного обеспечения ZEN (Zeiss).

STR-анализ

Генотипирование образцов ДНК проводили в ООО “Гордиз” (<https://gordiz.ru/>) (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточной линии

Линия ИПСК iTAF15Xsk4 получена репрограммированием фибробластов пациентки с привычным невынашиванием беременности с делецией в Xq24 размером 239 т.п.н., включающей ген *UBE2A*. Паспорт клеточной линии приведен в табл. 2. Для репрограммирования использовали эписомные векторы, которые элиминируются при культивировании клеток (Okita et al., 2013). Линия ИПСК iTAF15Xsk4 имела морфологию эмбриональных стволовых клеток человека (рис. 1а) и нормальный кариотип 46,XX (рис. 1б). ПЦР-анализ не выявил присутствия ДНК микоплазмы (рис. 1д). На пассаже 10 клетки экспрессировали транскрипционные факторы OCT4 и NANOG (рис. 1в, 1г, 1ж). При дифференцировке в эмбрионидные тельца клетки экспрессировали маркеры всех трех зародышевых листков (рис. 1з). STR-анализ показал идентичность iTAF15Xsk4 и исходных фибробластов TAF15 (данные доступны по запросу). Делеция в Xq24 в ИПСК была подтверждена с помощью ПЦР-РВ (рис. 1и, 1к). Полная характеристика линии приведена в табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

ИПСК линии iTAF15Xsk4 имеют морфологию эмбриональных стволовых клеток человека и плюрипотентны. Мы использовали неинтегриру-

Таблица 1. Антитела и праймеры

	Антитела			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit anti-OCT4	1 : 500	Cell Signalling, 2750	RRID: AB_823583
	Rabbit anti-NANOG	1 : 500	Cell Signaling, 4903	RRID: AB_10559205
Вторичные антитела	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 546	1 : 200	Thermo Fisher Scientific, A-11010	RRID: AB_2534077
	Праймеры			
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')	
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544 п.н.	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC	
Детекция эписомных векторов	<i>EBNA-1</i>	666 п.н.	ATCGTCAAAGCTGCACACAG/ CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA	
Детекция микоплазмы	<i>Myco1</i>	280 п.н.	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC	
Детекция микоплазмы	<i>Myco2</i>	206 п.н.	GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC/ GGTTATTCGATTTCTAAATCGCCT	
Детекция микоплазмы	<i>Myco3</i>	170 п.н.	ATACATGCATGTGCGAGCGAG/ CATCTTTTAGTGGCGCCTTAC	
Детекция микоплазмы	<i>Myco4</i>	407 п.н.	CATGCAAGTCGGACGAAGCA/ AGCATTCCTCTTCTTACAA	
Подтверждение делеции, контрольный ген (ПЦР-РВ)	<i>HEXB</i>	136 п.н.	CCGGGCACAATAGTTGAAGT/ TCCTCCAATCTTGTCCATAGC	
Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)	<i>UBE2A</i>	92 п.н.	CAAAGCTGGCGTGATTGTTG/ GGAGTAGGGAGGTGACAAACA	
Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)	<i>SEPTIN6</i>	112 п.н.	GACACCCTGTTCAACACCAAA/ GCTTTAGCCTCACGTTGCTC	
Ген домашнего хозяйства	<i>GAPDH</i>	153 п.н.	GTGGACCTGACCTGCCGTCT/ GGAGGAGTGGGTGTGCTGT	
Маркер плюрипотентности	<i>NANOG</i>	110 п.н.	AAAGAATCTTCACCTATGCC/ GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	
Маркер плюрипотентности	<i>OCT4</i>	128 п.н.	CTGGGTTGATCCTCGGACCT/ CACAGAACTCATACGGCGGG	
Маркер эктодермы	<i>SOX1</i>	133 п.н.	CACAACCTCGGAGATCAGCAA/ GGTACTTGTAATCCGGGTGC	
Маркер эктодермы	<i>MAP2</i>	212 п.н.	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG/ CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG	
Маркер мезодермы	<i>FLK1</i>	131 п.н.	TGATCGGAAATGACACTGGA/ CACGACTCCATGTTGGTCAC	
Маркер мезодермы	<i>MSX1</i>	307 п.н.	CGAGAGGACCCCGTGATGCAGAG/ GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG	
Маркер энтодермы	<i>FOXA2</i>	122 п.н.	GGAGCGGTGAAGATGGAA/ TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT	
Маркер энтодермы	<i>AFP</i>	136 п.н.	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT/ GCCACAGGCCAATAGTTTGT	

Таблица 2. Паспорт линии ИПСК iTAF15Xsk4

Уникальный идентификатор	iTAF15Xsk4
Альтернативное название линии	iTAF15Xsk4
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия; Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (протокол № 10 от 15.02.2021)
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 29 Пол: F Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Фибробласты кожи
Дата забора биоматериала	Ноябрь 2019 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограмирующих генетических конструкций	ПЦР, детектируются
Заболевание	Привычное невынашивание беременности
Ген/локус	arr[hg19] Xq24(118555586_118794279)×1mat по данным хромосомного микроматричного анализа лимфоцитов периферической крови пациентки с использованием ДНК-микроматриц SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K Microarray Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (микроделеция в Xq24, затрагивает восемь генов: <i>SLC25A43</i> , <i>SLC25A5-AS1</i> , <i>SLC25A5</i> , <i>STEEPI</i> , <i>UBE2A</i> , <i>NKRF</i> , <i>SEPTIN6</i> и <i>MIR766</i>)
Морфология	Эмбриональные стволовые клетки человека (праймированные)
Плюрипотентность	Подтверждена в тесте на формирование эмбрионидных телес
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Изучение синдрома дефицита гена <i>UBE2A</i>
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом фидером
Среда культивирования	DMEM/F12, 20% KSR, NEAA, GlutaMAX, PenStrep, 2-mercaptoethanol, bFGF
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	Механический
Кратность пересева	1 : 2–1 : 6
Криоконсервация	90% KSR, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL/entities/221
Дата паспортизации/депонирования	26/08/2022

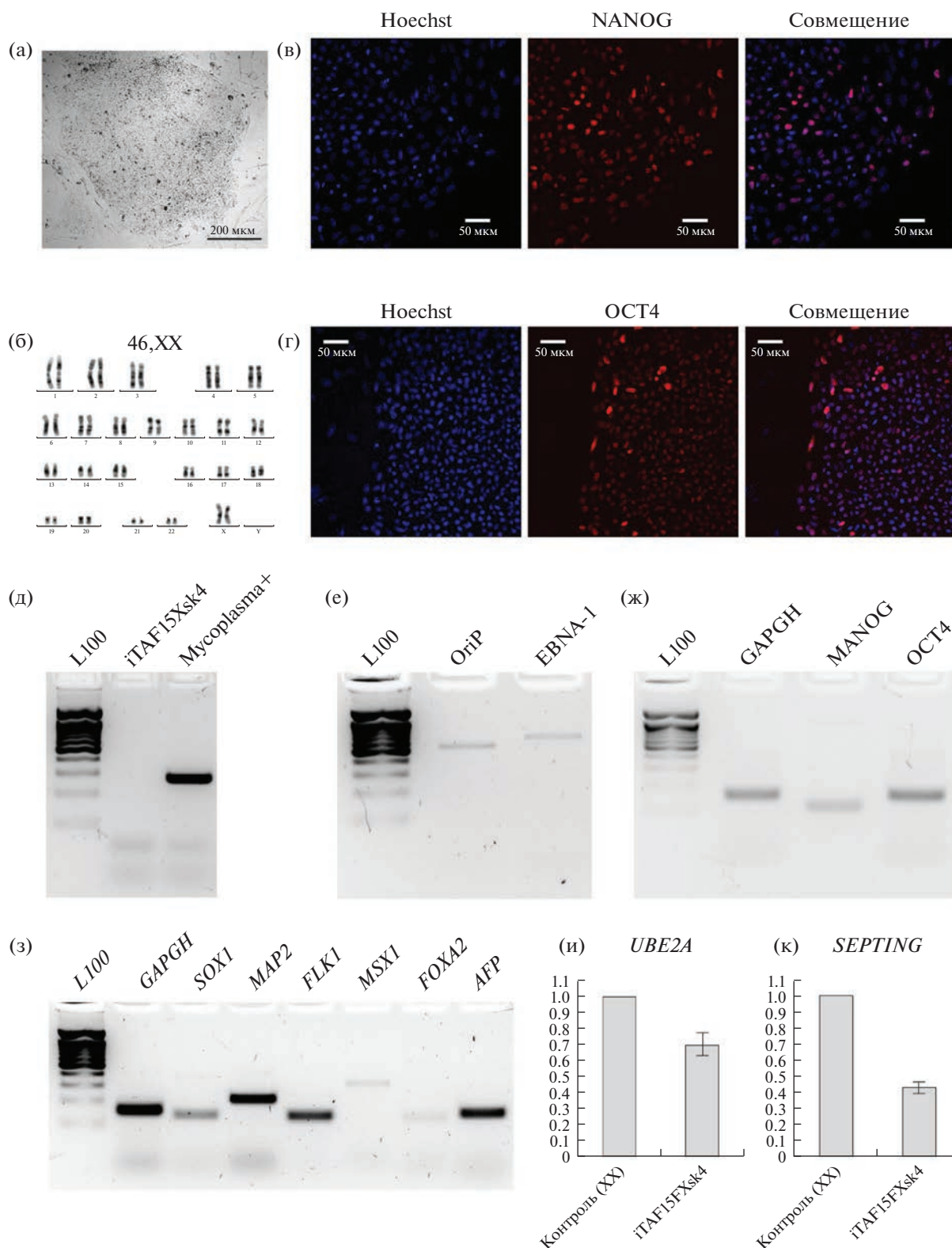


Рис. 1. Характеристика линии ИПСК iTAF15Xsk4. (а) Морфология колоний; (б) метафазная пластинка на пассаже 10; (в) иммуноцитохимическое окрашивание на NANOG; (г) иммуноцитохимическое окрашивание на OCT4; (д) ПЦР анализ на контаминацию микоплазмой; (е) ПЦР анализ присутствия эписом; (ж) ОТ-ПЦР анализ на маркеры плюрипотентности; (з) ОТ-ПЦР анализ на маркеры дифференцировки в экто- (*SOX1* и *MAP2*), мезо- (*FLK1* и *MSX1*) и энтодерму (*FOXA2* и *AFP*); (и) подтверждение делеции *UBE2A* (ПЦР-РВ), указано среднее $\pm$ стандартное отклонение; (к) подтверждение делеции *SEPTIN6* (ПЦР-РВ), указано среднее $\pm$ стандартное отклонение. L100 – ДНК-маркер 100 bp + 1.5 kb (SibEnzyme).

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека iTAF15Xsk4

Параметр	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Типичная морфология праймированных плюрипотентных стволовых клеток человека	Рис. 1а
Фенотип	Качественный анализ Иммунофлуоресцентное окрашивание	Выявляются маркеры плюрипотентности NANOG и OCT4	Рис. 1в, 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XX	Рис. 1б
Идентификация	STR-анализ	19 из 19 полиморфных локусов совпадают с фибробластами	Доступны по запросу у авторов
Контаминация	Микопlasма	Отсутствует	—
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбриоидных тел, ОТ-ПЦР	Выявлены маркеры трех зародышевых листков: <i>SOX1</i> и <i>MAP2</i> (эктодерма), <i>FLK1</i> и <i>MSX1</i> (мезодерма), <i>FOXA2</i> и <i>AFP</i> (энтодерма)	Рис. 1ж
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

ющиеся эписомные векторы для доставки репрограммирующих факторов. По литературным данным за одно деление клеток 2–8% эписом элиминируются (Drozd et al., 2015), на пассаже 10 мы показали присутствие эписом (рис. 1е). Используемый метод анализа, ПЦР тотальной ДНК, не позволят оценить копийность эписом и процент их содержащих клеток. Для правильной дифференцировки ИПСК экзогенные транскрипционные факторы не должны экспрессироваться, поэтому для полного элиминирования эписом необходимо культивировать ИПСК еще несколько недель.

Полученную линию ИСПК в дальнейшем можно будет использовать для изучения эффекта делеции гена *UBE2A*. Также, потенциально, ИПСК можно использовать для изучения инактивации X-хромосомы. Для этого будет необходимо перевести клетки на стадию наивной плюрипотентности, хотя в некоторых работах показана неслучайная инактивация X-хромосом при дифференцировке “наивных” ИПСК. Также, нужно будет проверить клетки на наличие эрозии инактивации

X-хромосом. Из-за того, что эрозия сохраняется в дифференцированных клетках, линии с эродированной инактивацией X-хромосомы непригодны для изучения механизмов X-инактивации (Zhou et al., 2023).

БЛАГОДАРНОСТИ

Получение и культивирование ИПСК проводили на базе ЦКП “Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепромышленного и биомедицинского направления” ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). Визуализацию результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанного бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNР-2022-0019. Получение биоптата кожи и культивирование первичных фибробластов проводилось на базе Центра коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского НИМЦ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021). Получение первичных фибробластов кожи проводилось при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-65-00017.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (Протокол № 10 от 15.02.2021). Пациенткой было собственноручно подписано добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Г. Мензоров провел репрограммирование фибробластов и получил линию ИПСК. И.Е. Пристяжнюк провела цитогенетический анализ. Н.И. Мещеряков выполнил выделение ДНК и РНК, ПЦР и ОТ-ПЦР анализ. Т.В. Никитина культивировала первичные фибробласты. А.А. Кашеварова и Д.А. Федотов провели ПЦР-РВ. Медицинское сопровождение пациента и получение биоптата кожи проводили Е.Н. Толмачева, Л.И. Минайчева и Л.П. Назаренко. А.Г. Мензоров и И.Н. Лебедев разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chechetkina S.A., Khabarova A.A., Chvileva A.S. et al.* Generation of two iPSC lines from healthy donor with a heterozygous mutation in the VPS13B gene // *Stem. Cell Res.* 2021. V. 59. P. 102648. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102648>
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al.* 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. V. 12. № 5. P. 301–308. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0186>
- Drozd A.M., Walczak M.P., Piaskowski S. et al.* Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system // *Stem. Cell Res. Ther.* 2015. V. 6. № 1. P. 122. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0112-3>
- Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nbt.1502>
- Nascimento R.M.P., Otto P.A., de Brouwer A.P.M. et al.* UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 79. № 3. P. 549–555. <https://doi.org/10.1086/507047>
- Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Generation of two iPSC lines (IMGTi001-A and IMGTi001-B) from human skin fibroblasts with ring chromosome 22 // *Stem. Cell Res.* 2018a. V. 31. P. 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.08.012>
- Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Induced pluripotent stem cell line, IMGTi003-A, derived from skin fibroblasts of an intellectually disabled patient with ring chromosome 13 // *Stem. Cell Res.* 2018b. V. 33. P. 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.11.009>
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 3. P. 458–466. <https://doi.org/10.1002/stem.1293>
- Prokhorovich M.A., Lagar'kova M.A., Shilov A.G. et al.* Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. V. 144. № 1. P. 126–129. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0271-z>
- Shnaider T.A., Pristiyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. et al.* Generation of four iPSC lines from two siblings with a microdeletion at the CNTN6 gene and intellectual disability // *Stem. Cell Res.* 2019. V. 41. P. 101591. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101591>
- Thunstrom S., Sodermark L., Ivarsson L. et al.* UBE2A deficiency syndrome: a report of two unrelated cases with large Xq24 deletions encompassing UBE2A gene // *Am. J. Med. Genet. A.* 2015. V. 167A. № 1. P. 204–210. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36800>
- Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P. et al.* Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from UBE2A deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // *Cytogenet. Genome Res.* 2020. V. 160. № 5. P. 245–254. <https://doi.org/10.1159/000508050>
- Zhou J., Hu J., Wang Y. et al.* Induction and application of human naive pluripotency // *Cell Rep.* 2023. V. 42. № 4. P. 112379. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112379>

Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Line iTAF15Xsk4 from Fibroblasts of a Patient with Microdeletion at Xq24

I. E. Pristyazhnyuk¹, N. I. Meshcheryakov^{1, 2}, T. V. Nikitina³, A. A. Kashevarova³, D. A. Fedotov³, E. N. Tolmacheva³, L. I. Minaycheva³, L. P. Nazarenko³, I. N. Lebedev³, and A. G. Menzorov^{1, 2, *}

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk, 634050 Russia*

**e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru*

Differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells from patients and healthy donors allows in vitro study of genetic disorders. We have previously reported a clinical case of recurrent pregnancy loss in a patient with skewed X-chromosome inactivation in peripheral blood lymphocytes, endometrium, and buccal epithelium. We have found a 239 kb microdeletion at Xq24 that affected eight genes including *UBE2A*. In this work, we produced iPS cell line iTAF15Xsk4 from the patient's skin fibroblasts using non-integrating episomal vectors. iPS cell line had a normal karyotype, expressed pluripotency markers, and upon differentiation in embryoid bodies expressed markers of all three germ layers. This cell line could be used for the *UBE2A* deficiency syndrome study.

Keywords: iPS cells, Xq24 microdeletion, *UBE2A* deficiency syndrome, recurrent pregnancy loss, skewed X-chromosome inactivation

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК RCPSCMi009-A-1 С НОКАУТОМ ГЕНА *UBE2A* С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/Cas9

© 2023 г. Е. А. Хомякова^{a, *}, А. В. Федоренко^{a, e}, А. В. Сурдина^a, Е. А. Воловиков^{a, b},
Л. Д. Беликова^{a, b}, Е. А. Зеркаленкова^c, М. А. Лагарькова^{a, d}, А. Н. Богомазова^{a, b, d}

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435 Россия

^bНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, пер. Кооперативный, 5, Томск, 634050 Россия

^cФедеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997 Россия

^dЦентр высокоточного редактирования генома и генетических технологий в биомедицине, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435 Россия

^eСколковский институт науки и технологий, Большой бул., 30, стр. 1, Москва, 121205 Россия

*e-mail: kate.hom@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

Делеции и мутации в гене *UBE2A* вызывают X-сцепленный синдром умственной отсталости типа Насименто, впервые описанный в 2006 г. (Nascimento et al., 2006). На настоящий момент известно около двух десятков миссенс- и нонсенс-мутаций в гене *UBE2A*, ассоциированных с синдромом умственной отсталости по типу Насименто (Cordeddu et al., 2020). Для изучения роли гена *UBE2A* в развитии центральной нервной системы мы создали линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека с нокаутом гена *UBE2A* (RCPSCMi009-A-1) с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Нокаут гена *UBE2A* был подтвержден Вестерн-блоттингом. Плюрипотентность линии ИПСК RCPSCMi009-A-1 была подтверждена типичной морфологией плюрипотентных стволовых клеток, нормальным кариотипом (46,XY), экспрессией маркеров плюрипотентности и способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.

Ключевые слова: X-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ген *UBE2A*, нокаут

DOI: 10.31857/S0475145023060046, EDN: HKXTMY

ВВЕДЕНИЕ

В 2006 г. Насименто с соавторами сообщили, что делеции, затрагивающие ген убиквитин-связывающий белок E2 A (*UBE2A*, ubiquitin conjugating enzyme E2 A), приводят к новому синдрому умственной отсталости, сцепленному с X-хромосомой (Nascimento et al., 2006). Ген *UBE2A* кодирует убиквитин-связывающий белок E2, который участвует в убиквитинировании белков и играет роль в нескольких критических клеточных про-

цессах, включая репарацию пострепликационных повреждений ДНК, регуляцию транскрипции и митофагию (Dover et al., 2003; Hibber et al., 2011; Wojcik et al., 2018). Однако роль белка *UBE2A* в нейрогенезе еще не изучена, и неясно, как мутации в гене *UBE2A*, ведущие к дисфункциональности белка *UBE2A*, связаны с врожденной умственной отсталостью. Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с нокаутом гена *UBE2A* RCPSCMi009-A-1 может

быть использована в дифференцировке в нейральные клетки или мозговые органоиды при изучении и моделировании синдрома Насименто *in vitro*. Таким образом, линия RCPCMi009-A-1 может помочь идентифицировать UBE2A-зависимые клеточные процессы, нарушение которых приводит к патологии развития центральной нервной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования ИПСК

ИПСК RCPCMi009-A (<https://hpscreg.eu/cell-line/RCPCMi009-A>) культивировали в среде mTeSR™1 (Stemcell Technologies) на предварительно покрытых Матригелем (Corning) чашках Петри при 37°C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, влажность 80%). Пассирование клеток проводили с использованием 0.05% раствора трипсин-ЭДТА (Gibco).

Создание линий ИПСК с нокаутом

Направляющая РНК (нРНК), нацеленная на второй экзон гена *UBE2A*, была подобрана при помощи онлайн-инструмента CRISPOR (Concordet, Haeussler, 2018). Для трансфекции ИПСК использовали плазмиду PX458 (Addgene #48138), кодирующую нРНК, нуклеазу Cas9 и зеленый флуоресцентный белок GFP. ИПСК трансфицировали реагентом TransIT®-LT1 (MirusBio) в соответствии с протоколом производителя. На второй день после трансфекции GFP-положительные клетки сортировали и высевали при низкой плотности в среду mTeSR™1 с добавлением 10 мМ ингибитора ROCK Y27632 (Miltenyi Biotec) и реагента CloneR (Stemcell Technologies) при помощи прибора BD FACSMelody (BD). Через десять дней колонии отбирали вручную и высевали в индивидуальные лунки 48-луночного планшета (Corning), предварительно обработанного Матригелем. При следующем пересеве из части клеток каждого клона выделяли ДНК с последующей ПЦР и секвенированием по Сэнгеру.

Проточная цитометрия

Для получения одноклеточной суспензии ИПСК использовали раствор трипсин-ЭДТА (0.05%). Собранные клетки инкубировали с первичными антителами в течение 15 мин при комнатной температуре при окраске поверхностных маркеров SSEA-4 и SOX2 или фиксировали в 4% PFA в течение 15 мин на льду при окраске ядерного маркера OCT4. Для окрашивания OCT4 клетки обрабатывали 80% холодным этанолом для пермеабилзации на льду в течение 30 мин, затем об-

разцы инкубировали с конъюгированными антителами (табл. 1) в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific) при 4°C в течение 60 мин. Для окрашивания на поверхностные маркеры SSEA-4 и SOX2 образцы инкубировали с вторичными антителами (табл. 1) при 4°C в течение 30 мин в темноте. После промывки клетки анализировали на проточном цитометре NovoCyte.

Секвенирование по Сэнгеру и анализ нецелевых эффектов редактирования

Геномную ДНК выделяли с помощью набора М-сорб (Синтол). Для прогнозирования потенциальных нецелевых эффектов редактирования генома CRISPR/Cas9 использовали онлайн-инструмент Off-Spotter (Pliatsika, Rigoutsos, 2015). Затем проводили секвенирование по Сэнгеру ампликонов, полученных в результате ПЦР с праймерами, охватывающими целевую область в гене *UBE2A* и потенциальные нецелевые участки (табл. 1).

*Спонтанная дифференцировка *in vitro**

Эмбрионидные тельца формировали с использованием планшетов Aggrewell400 (Stemcell Technologies). Затем их переносили на чашки со сверхнизкой адгезией (Corning) и культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко), содержащей 15% KnockOut Serum Replacement (KO SR) (Invitrogen), 5% FBS (Thermo Fisher Scientific), 0.1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 1% NEAA (ПанЭко) и 1% пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific). В течение двадцати дней постепенно снижали процент содержания KO SR до нуля и увеличивали процент FBS до 10%. Через двадцать дней эмбрионидные тельца высевали на покрытые матригелем 48-луночные планшеты в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, 1% пенициллина-стрептомицина, и культивировали в течение следующих 10 дней. Среду меняли каждые 3 дня. Затем эмбрионидные тельца фиксировали в 4% PFA и окрашивали на специфические маркеры трех зародышевых листков (табл. 1).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% PFA (Sigma-Aldrich), разведенном на фосфатном буфере (ПанЭко), в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем их пермеабилizовали в 0.1% Тритоне X-100 (Sigma-Aldrich) в течение 10 мин и инкубировали с блокирующим раствором (PBS, 0.1% Tween20, 2.5% FBS, 2.5% Goat Serum) в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки инкубировали с

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела, использованные в исследовании			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit IgG anti-OCT4	1 : 100	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
	Mouse Alexa Fluor 488 anti-Oct4 (Oct3)	5 мкл : 1 млн клеток	Sony Biotechnology, 3868525	RRID:AB_2940931
	Rabbit IgG anti-SOX2	1 : 2000	Abcam, ab97959	RRID:AB_2341193
	Mouse IgG3 anti-SSEA-4	1 : 50	DSHB, MC-813-70	RRID:AB_528477
	Mouse IgM anti-TRA-1-81	1 : 100	Cell Signaling Technology, 4745	RRID:AB_2119060
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2b, kappa anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/Clone: AMC0115	1 : 1000	ABclonal, A18132	RRID:AB_2861923
	Rabbit IgG anti-human HNF3 β /FOXA2	1 : 150	ABclonal, A19053	RRID:AB_2862546
	Rabbit IgG anti-human Vimentin/Clone: SP20	1 : 100	Thermo Fisher, RM-9120-S0	RRID:AB_722371
	Mouse IgG1 anti-human cyto-keratin PAN (CK PAN)	1 : 100	PrimeBioMed, 10-310046	RRID:AB_2940932
Целевой белок UBE2A	Rabbit IgG anti-UBE2A	1 : 100	Thermo Fisher Scientific, PA5-112140	RRID:AB_2866876
Референсный белок	Rabbit anti-human TATA binding protein TBP	1 : 100	Abcam, ab63766	RRID:AB_1281140
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	1 : 800	Thermo Fisher Scientific, A21422	RRID:AB_2535844
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 800	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	1 : 800	Thermo Fisher Scientific, A21236	RRID:AB_2535805
	Rabbit anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	1 : 80000	Sigma-Aldrich, A9044	RRID:AB_258431
	Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	1 : 1000	Sigma-Aldrich, A9169	RRID:AB_258434

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта, п.н.	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Референсный ген (ОТ-ПЦР)	<i>GAPDH</i>	118	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA/ GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	887	CCTTCGCAAGCCCTCATTTTC/ AACCACACTCGGACCACATC
	<i>SOX2</i>	278	AACCAGCGCATGGACAGTTA/ GACTTGACCACCGAACCCAT
	<i>SALL4</i>	303	TGGCGGAGAGGGCAAATAAC/ ATGCTGAAGAACTCCGCACA
Детекция микоплазмы	Ген рибосомной 16S РНК (праймеры GPO1/MGSO)	705–708	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA/ TGCACCATCTGTCACTCTGTAACTC
нРНК	<i>UBE2A</i> -нРНК		CAACATAATGGTGTGGAACG
Случайная интеграция плазмиды в геном	PX458 плазида	1123	CTGGGCACATACCACGATCTG/ CGGACACCAGCTTGGACTTCAG
Анализ целевой мутации/секвенирование	Экзон 2 гена <i>UBE2A</i> chrX:118,708,862-118,708,945	520	CCCTCGACTTCGGAGA/ AACATTTTCCCCTACCCGCT
Потенциальные нецелевые эффекты редактирования	<i>SNX11</i>	114	TGGAAAGTCCCACTCTCCCA/ CATGATCTCCTCCCACAGCC
	<i>KDM6B</i>	354	CGTGGACTACTTGACGGGTT/ CTGGTACTGATAGGCTGCGG
	<i>KCNE1</i>	316	ACAGTTGAGCCAAACTCCAA/ CCCCTAACAAGAGCCAAACAGT
	<i>RP11-7</i> exon_RP11-7F17.5/RP11-7F17.3	528	CGGTACATTGCTCAGACTCCA/ TAGTACAGACACAGCGCCAG
	<i>SMYD3</i>	477	TGCTCAGCAAGTCCTGCTTATTT/ GTGGTTCTCATGGGGTCGTT

первичными антителами в течение ночи при 4°C и с вторичными антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации ядер клетки окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich). Изображения были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ni-E и цифровой камеры DS-Qi2 (Nikon), обработаны с помощью программного обеспечения BR NIS-Elements (Nikon).

Вестерн-блоттинг

Для получения белковых лизатов растворяли сухой осадок клеток в буфере RIPA (Servicebio), тщательно перемешивали и инкубировали 1 ч при 4°C. Затем добавляли равный объем двукратного буфера Лемли (Biorad), перемешивали и инкуби-

ровали 10 мин в сухом термостате при 92°C. Под тягой готовили и заливали 10% разделяющий гель и 5% концентрирующий гель. Электрофорез проводили при 200 В.

После окончания электрофореза проводили перенос белков с геля на PVDF мембрану в приборе Trans-Blot Turbo (Biorad) в течение 30 мин при 25 В. Затем мембрану отмывали в 5% Biorad Blocker в PBS и инкубировали с первичными антителами ночь при 4°C.

На следующий день отмывали мембрану PBST, 1 ч инкубировали с вторичными антителами, затем отмывали раствором PBST. Визуализировали на гель-документирующей системе Chemi-Doc (Biorad) с помощью реактивов ECL Femto-Sensitivity (Invitrogen).

Кариотипирование и STR анализ

Подготовку препаратов метафазных хромосом проводили как описано ранее (Vogomazova et al., 2011). Дифференциальное G-окрашивание хромосом проводили по стандартному протоколу (Czepulkowski et al., 1992). Было проанализировано не менее 20 метафаз с минимальным разрешением 400 полос. Метафазы анализировали с использованием полуавтоматической системы Metafer и программного обеспечения IKAROS (MetaSystems). STR-анализ (англ. — short tandem repeat) выполнен с помощью набора STR-маркеров COrDIS Plus (Гордиз).

Выделение РНК и проведение ОТ-ПЦР

РНК выделяли с использованием набора RNAeasy Mini (Qiagen). Обратную транскрипцию проводили со случайными праймерами (Евроген) и набором М-MLV (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя. ОТ-ПЦР проводили с использованием специфических праймеров (табл. 1).

Выявление микоплазмы

Отсутствие микоплазмы было подтверждено при помощи ПЦР с использованием праймеров GPO1 и MGSO на ген рибосомной 16S РНК (Van Kuppeveld et al., 1992) (табл. 1).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Паспорт клеточной линии ИПСК RCPCMi009-A-1 представлен в табл. 2, полная характеристика этой линии приведена на рис. 1 и в табл. 3.

В настоящем исследовании мы создали клон ИПСК с нокаутом гена *UBE2A* RCPCMi009-A-1 из линии ИПСК RCPCMi009-A, полученной ранее от здорового донора мужчины (Holmqvist et al., 2016). Направляющая РНК, нацеленная на второй экзон гена *UBE2A*, была выбрана с помощью онлайн-инструмента CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). нРНК клонировали в плазмиду PX458, содержащую гены, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и флуоресцентный репортер GFP. Полученную плазмиду трансфицировали в ИПСК RCPCMi009-A посредством липофекции. GFP-положительные клетки сортировали и высевали при низкой плотности (3000 клеток/см²) на второй день после трансфекции. Всего было отобрано 48 клонов ИПСК. Среди этих клонов с помощью секвенирования по Сэнгеру было выявлено шесть клонов ИПСК с мутациями сдвига рамки считывания в целевой области. RCPCMi009-A-1

представляет собой клон ИПСК с гемизиготной вставкой нуклеотида аденозина в месте разреза Cas9-эндонуклеазой (рис. 1а, 1в). Для этого клона было продемонстрировано отсутствие нецелевых мутаций в пяти локусах, предсказанных с помощью онлайн-инструмента Off-Spotter (рис. 2).

Генетические манипуляции, приведшие к нокауту гена *UBE2A*, не повлияли на плюрипотентное состояние отредактированных ИПСК. Клеточная линия с нокаутом гена *UBE2A* RCPCMi009-A-1 обладает типичной морфологией плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 1б). Методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, была подтверждена экспрессия мРНК *OCT4*, *SOX2* и *SALL4* в RCPCMi009-A-1 (рис. 1г). Клетки линии RCPCMi009-A-1 экспрессируют типичные маркеры плюрипотентности, включая транскрипционные факторы *OCT4* и *SOX2*, а также поверхностные антигены SSEA-4 и TRA-1-81 (рис. 1д). При спонтанной дифференцировке *in vitro* были обнаружены клетки всех трех зародышевых листков, включая эктодерму (панцитокератин, β III-тубулин), мезодерму (виментин) и энтодерму (HNF3beta) (рис. 1е). Проточная цитометрия также подтвердила высокую экспрессию маркеров плюрипотентности *OCT4*, SSEA-4 и TRA-1-81 (рис. 1ж). С помощью Вестерн-блоттинга было подтверждено отсутствие белка *UBE2A* в ИПСК RCPCMi009-A-1 по сравнению с исходными ИПСК RCPCMi009-A (рис. 1з). Клеточная линия RCPCMi009-A-1 демонстрирует хромосомную стабильность и нормальный кариотип 46,XY на 40-м пассаже (рис. 1и). Методом ПЦР показано, что линия RCPCMi009-A-1 свободна от микоплазмы (рис. 1к). В геноме линии RCPCMi009-A-1 не выявлено следов интеграции плазмиды PX458 и, в частности, гена, кодирующего эндонуклеазу Cas9 (рис. 1л). Пересев исходной линии ИПСК RCPCMi009-A и отредактированной линии ИПСК RCPCMi009-A-1 с одной периодичностью свидетельствует о том, что пролиферация и жизнеспособность ИПСК RCPCMi009-A-1 не была нарушена. Профиль STR линии ИПСК RCPCMi009-A-1 полностью соответствовал профилю родительского клона ИПСК RCPCMi009-A (данные доступны по запросу у авторов).

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий в биомедицине Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина за их экспертизу и руководство в области редактирования генома.

Таблица 2. Паспорт клеточной линии ИПСК человека RCPCMi009-A-1

Уникальный идентификатор	RCPCMi009-A-1
Альтернативное название линии	IPSRG4S-206
Учреждение	Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, протокол № 1 от 1/06/2021
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 64 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса Фибробласты кожи
Исходный тип клеток	2011 год
Дата забора биоматериала	Неинтегрирующие векторы, вирус Sendai
Способ репрограммирования	OCT4, KLF4, C-MYC, SOX2
Репрограммирующие факторы	Клональные
Клональность	Нокаут гена <i>UBE2A</i>
Генетическая модификация	Инсерция одного нуклеотида (аденозина), приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона
Вид генетической модификации	ПЦР, не детектируются
Подтверждение элиминации/ замолкания репрограммирующих трансгенов	Х-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто (MIM#300860, https://omim.org/entry/300860)
Заболевание	<i>UBE2A</i>
Ген/локус	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным стволовым клеткам человека
Морфология	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел и окрашивание специфических маркеров
Плюрипотентность	46,XY
Кариотип	Микоплазма не обнаружена
Проверка контаминации	<i>In vitro</i> модель Х-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто
Область применения	На подложке из Матригеля
Способ культивирования	mTeSR™1 (Stemcell Technologies), 1% пенициллин-стрептомицин
Среда культивирования	37
Температура, °C	5
Концентрация CO ₂ , %	20
Концентрация O ₂ , %	Энзиматический, трипсин-ЭДТА (Gibco)
Способ пересева	1 : 8–1 : 10
Кратность пересева	90% FBS, 10% DMSO, 10 мМ ингибитора ROCK Y27632
Криоконсервация	(Miltenyi Biotec)
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/RCPCMi009-A-1
Дата паспортизации	09/06/2023

Рис. 1. Характеристика линии ИПСК человека RCPCMi009-A-1. (а) Гемизиготная однонуклеотидная инсерция во 2-ом экзоне гена *UBE2A*, приводящая к образованию преждевременных стоп-кодонов в линии ИПСК RCPCMi009-A-1; (б) ЭСК-подобная морфология клеток линии ИПСК RCPCMi009-A-1, растущих на пластике, обработанном белками внеклеточного матрикса; (в) электрофореграмма участка экзона 2 гена *UBE2A*, подтверждающая присутствие однонуклеотидной инсерции в гемизиготном состоянии; (г) ОТ-ПЦР маркеров плюрипотентности (*OCT4*, *SOX2* и *SALL4*) линии ИПСК RCPCMi009-A-1 и исходной линии; (д) иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: ядерные (*OCT4*, *SOX2*) и поверхностные (*SSEA-4*, *TRA-1-81*); (е) иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: эктодермы (СК PAN, βIII-тубулин), мезодермы (виментин) и энтодермы (*HNF3beta*); (ж) проточная цитометрия линии ИПСК RCPCMi009-A-1 на маркеры плюрипотентности: ядерные (*OCT4*) и поверхностные (*SSEA-4*, *TRA-1-81*); (з) Вестерн-блот анализ с антителами к белку *UBE2A* в линии ИПСК RCPCMi009-A-1 и исходной линии ИПСК; (и) кариотип (46,XY) линии ИПСК RCPCMi009-A-1; (к) ПЦР анализ на отсутствие микоплазмы у линии ИПСК RCPCMi009-A-1 и исходной линии ИПСК; (л) ПЦР анализ на отсутствие дополнительной случайной интеграции плазмиды PX458 в геном линии ИПСК RCPCMi009-A-1 и исходной линии ИПСК. Все масштабные линейки – 100 мкм. WT – дикий тип; KO – нокаут; –K – отрицательный контроль, +K – положительный контроль; gRNA – направляющая РНК; Ex – экзон.

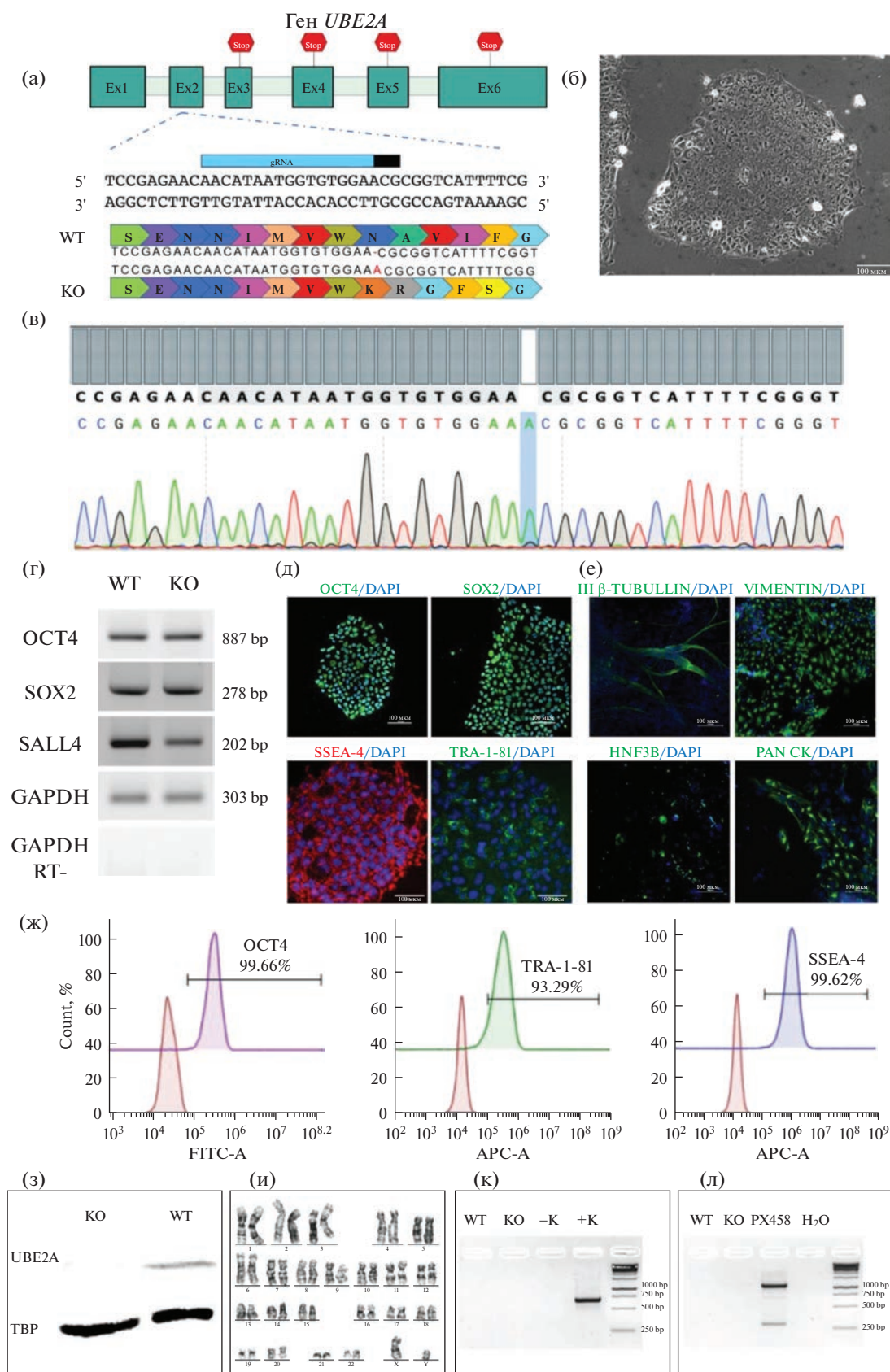


Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека RCPCMi009-A-1

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека	Рис. 1б
Фенотип	Иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81	Рис. 1д
	ОТ-ПЦР	Детекция фрагмента на геле после ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности: OCT4, SOX2, SALL4	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XY Разрешение 400 бэндов	Рис. 1и
Идентификация	STR анализ	20 из 20 полиморфных локусов совпадают с RCPCMi009-A	Данные доступны по запросу у авторов
Анализ внесенной генетической модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Подтверждено присутствие генетического варианта в гемизиготном состоянии	Рис. 1в
Анализ нецелевой активности	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 5 предсказанных сайтах	Рис. 2
Проверка отсутствия случайной интеграции плазмиды	ПЦР	Отсутствие случайной интеграции плазмиды PX458 в геном	Рис. 1л
Контаминация	Микопlasma	Отсутствует	Рис. 1к
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных телес, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: Vimentin (мезодерма); TUBB3 и CK PAN (эктодерма); HNF3b (энтодерма)	Рис. 1е
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

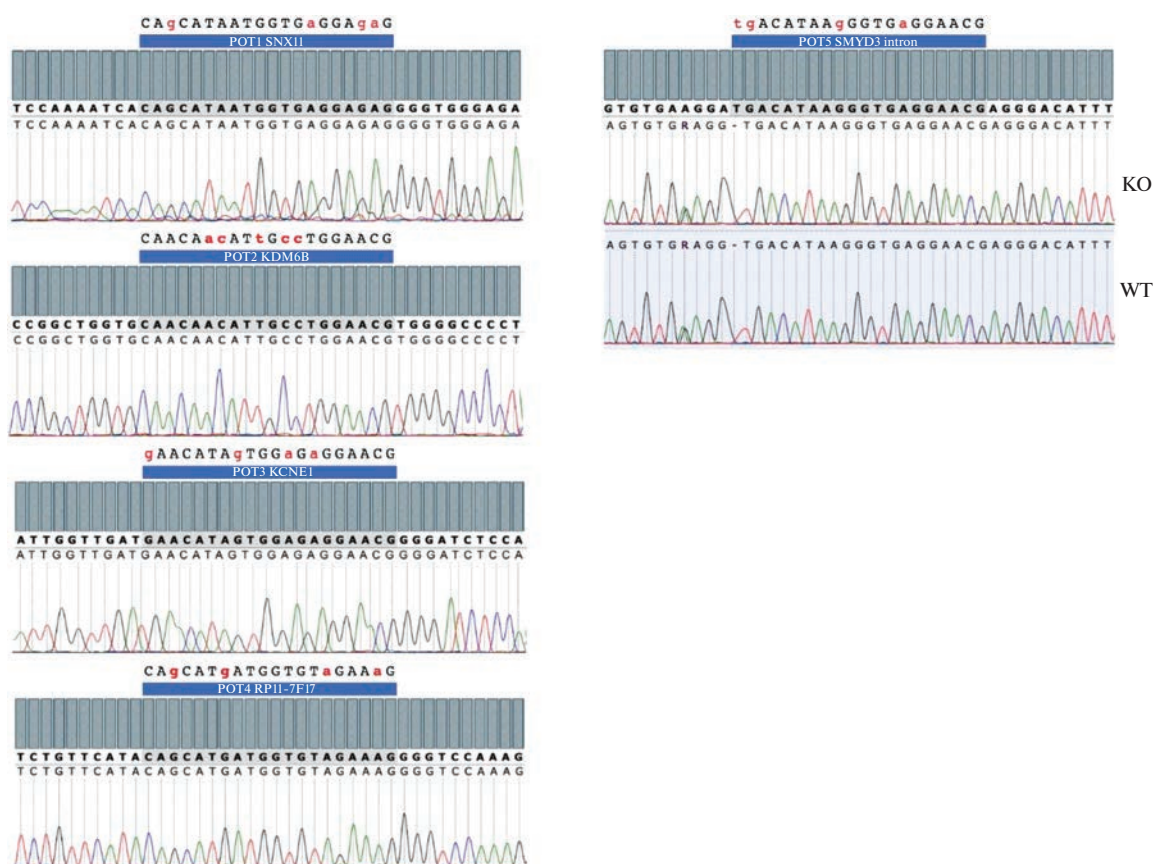


Рис. 2. Секвенирование не выявило каких-либо мутаций в основных прогнозируемых нецелевых (англ., POT – potential off-target) сайтах активности нуклеазы Cas9. SNP rs2362585 и rs5782373 гена SMYD3 идентифицированы как в родительской линии, так и в отредактированном клоне. WT – дикий тип; KO – нокаут.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование рассмотрено и одобрено 1 июня 2021 г. этической комиссией Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины, протокол № 1 от 1/06/2021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Хомякова и А.В. Федоренко выполняли культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, а именно: собрали плазмидный вектор с направляющей РНК, провели эксперименты по редактированию генома ИПСК, провели отбор индивидуальных кло-

нов ИПСК и их детальную характеристику, а также осуществили спонтанную дифференцировку ИПСК в производные трех зародышевых листков. А.В. Сурдина и Л.Д. Беликова провели анализ экспрессии маркеров плюрипотентности методом иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитометрии соответственно. Е.А. Воловиков проводил Вестерн-блоттинг. Е.А. Зеркаленкова выполнила анализ кариотипа линии ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*. М.А. Лагарькова и А.Н. Богомазова разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Tskhovrebova L.V. et al. Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2 // Aging (Albany NY). 2011. V. 3. № 6. P. 584.
- Concordet J.P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens // Nucleic Acids Research. 2018. V. 46. № W1. P. W242–W245.

- Czepulkowski B., Bhatt B., Rooney D. Malignancy and acquired abnormalities. Vol. 2. Oxford University Press. New York. 1992. V. 2. P. 1–25.
- Dover J., Schneider J., Tawiah-Boateng M.A. et al. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6 // J. Biological Chemistry. 2002. V. 277. № 32. P. 28368–28371.
- Hibbert R.G., Huang A., Boelens R. et al. E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. V. 108. № 14. P. 5590–5595.
- Holmqvist S., Lehtonen Š., Chumarina M. et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients // npj Parkinson's Disease. 2016. V. 2. № 1. P. 1–10.
- Nascimento R.M., Otto P.A., de Brouwer A.P. et al. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // The American J. Human Genetics. 2006. V. 79. № 3. P. 549–555.
- Pliatsika V., Rigoutsos I. “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs // Biology Direct. 2015. V. 10. P. 1–10.
- Van Kuppeveld F.J., Van der Logt J.T., Angulo A.F. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification // Applied and Environmental Microbiology. 1992. V. 58. № 8. P. 2606–2615.
- Wojcik F., Dann G.P., Beh L.Y. et al. Functional crosstalk between histone H2B ubiquitylation and H2A modifications and variants // Nature Communications. 2018. V. 9. № 1. P. 1–11.

Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells Line (RCPCMi009-A-1) with Knockout of the *UBE2A* Gene by CRISPR/Cas9 Genome Editing

E. A. Khomyakova^{1, *}, A. V. Fedorenko^{1, 5}, A. V. Surdina¹, E. A. Volovikov^{1, 2}, L. D. Belikova^{1, 2},
E. A. Zerkalenskova³, M. A. Lagarkova^{1, 4}, and A. N. Bogomazova^{1, 2, 4}

¹Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435 Russia

²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

³Rogachev Federal Scientific and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

⁴Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow, 119435 Russia

⁵Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

*e-mail: kate.hom@gmail.com

The deletions and mutations in the *UBE2A* gene cause X-linked mental retardation syndrome of Nascimento type first described in 2006 (Nascimento et al., 2006). To study the role of the *UBE2A* gene in neurodevelopment, we generated a human iPSC line with knockout of the *UBE2A* gene (RCPCMi009-A-1) using genome editing CRISPR/Cas9 technology. The knockout of the *UBE2A* gene was confirmed by Western blotting. The pluripotent state of the RCPCMi009-A-1 iPSCs line was confirmed by typical stem cell morphology, normal male karyotype maintenance, expression of pluripotency markers and the ability to differentiate into three germ layers.

Keywords: Nascimento type X-linked mental retardation, induced pluripotent stem cells, *UBE2A* gene, gene knockout

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линий плюрипотентных стволовых клеток

ТРАНСГЕННЫЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ICGi022-A-6 И ICGi022-A-7 С ДОКСИЦИКЛИН-УПРАВЛЯЕМЫМИ ВАРИАНТАМИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ НУКЛЕАЗЫ AsCas12a

© 2023 г. С. В. Павлова^{a, b, d}, К. Р. Валетдинова^a, Т. Б. Маланханова^a,
Д. Е. Поливцев^{a, c}, А. А. Малахова^{a, b, d}, Е. В. Григорьева^{a, b, d}, А. И. Шевченко^{a, b, d},
С. М. Закиян^{a, b, d}, С. П. Медведев^{a, b, d, *}

^aФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^bФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Министерства
здравоохранения Российской Федерации”, ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055 Россия

^cФГАОУВО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

^dФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук”, просп. акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.07.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 18.10.2023 г.

Редактирование геномов плюрипотентных стволовых клеток человека с применением программируемых нуклеаз позволяет создавать модели наследственных патологий с помощью направленного трансгенеза, нокаута генов и замены отдельных нуклеотидов в последовательностях ДНК. С использованием CRISPR/SpCas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе AAVS1 были получены клоны индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека ICGi022-A (Malakhova et al., 2020), которые несут трансгены двух вариантов нуклеазы AsCas12a (также известной как AsCpf1), распознающих разные консенсусы PAM (ICGi022-A-6 (AsCas12a, PAM 5'-TTTV-3') и ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3')), и трансген обратного доксициклин-зависимого транскриптора M2rtTA. С помощью Вестерн-блот анализа было показано, что добавление в культуральную среду доксициклина вызывает активацию экспрессии белков AsCas12a(TTTV) и AsCas12a(TYCV). Полученные трансгенные клоны ИПСК были подвергнуты молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу. С помощью количественной ПЦР и иммуноцитохимического анализа было показано, что в них наблюдается высокий уровень экспрессии мРНК генов-маркеров плюрипотентных клеток – OCT4, NANOG и SOX2, а также специфичная экспрессия белков-маркеров – OCT4, SOX2, SSEA-4 и TRA-1-60. Кроме того, с помощью метода спонтанной дифференцировки ИПСК в эмбриоидных тельцах, было установлено, что трансгенные клоны могут давать производные всех трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы. Цитогенетический анализ показал, что трансгенные клоны ИПСК имеют нормальный кариотип 46,XX.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), трансгенез, система CRISPR/Cas9, нуклеаза AsCas12a (AsCpf1), изогенные клеточные линии

DOI: 10.31857/S047514502306006X, **EDN:** GESSIW

ВВЕДЕНИЕ

Детальное исследование молекулярно-генетических механизмов патогенеза наследственных заболеваний является одной из актуальных задач современной биомедицины. В последние десяти-

летия в арсенале исследователей появились новые подходы, которые позволяют получать более совершенные модели для исследований *in vitro*. Например, технология получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и инструменты направленного

редактирования геномов, в частности, система CRISPR-Cas (Медведев и др., 2021). Программируемая нуклеаза AsCas12a (также известная как AsCpf1) обладает рядом специфических свойств, которые отличают ее от наиболее часто применяемого для направленного редактирования геномов фермента SpCas9. К этим свойствам относятся гидролиз ДНК-мишени в удалении от последовательности PAM (protospacer adjacent motif, мотив, прилегающий к протоспейсеру), более короткая направляющая РНК (около 40 н) и формирование липких концов при гидролизе ДНК-мишени (Zetsche et al., 2015). Кроме того, было показано, что AsCas12a обладает более низким по сравнению с SpCas9 уровнем нецелевой активности в клетках человека (Kim et al., 2016; Kleinstiver et al., 2016). Наличие Т-богатого консенсуса PAM (5'-TTTV-3') существенно сокращает выбор мишеней для природного варианта AsCas12a. Однако, эта проблема была решена путем создания генно-инженерных вариантов данного фермента, которые эффективно распознают вырожденные консенсусы PAM — 5'-TYCV-3' и 5'-TATV-3' (Gao et al., 2017). Более широкие возможности в выборе протоспейсеров для новых вариантов фермента и природные свойства AsCas12a делают данную программируемую нуклеазу перспективным инструментом для создания моделей наследственных болезней человека на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование донорной плазмиды pAAVS1-AsCpf1(TTTV)-2NLS

В плазмиду pAAVS1-donor, созданную в лаборатории на основе pBluescript SK(+) (Устьянцева и др., 2019), содержащую плечи гомологии локуса AAVS1, доксициклин-управляемый промотор и ген устойчивости к пуромицину, несущий сигнал полиаденилирования bGHpoly(A), был клонирован фрагмент ДНК, кодирующий AsCas12a (AsCpf1), узнающую PAM 5' TTTV 3' из плазмиды pY010 (pcDNA3.1-hAsCpf1) (Addgene plasmid # 69982; <http://n2t.net/addgene:69982>; RRID: Addgene_69982) (Zetsche et al., 2015). В последовательность нуклеазы AsCpf1 (TTTV) дополнительно к сигналу ядерной локализации nucleoplasmin NLS на С-конце, был добавлен SV40 NLS на N-конец, а также внесены сайт полиаденилирования SV40poly(A) и тройной гемагглютининовый эпитоп 3XHA (рис. 1а).

Конструирование донорной плазмиды pAAVS1-AsCpf1(TYCV)

В плазмиду pAAVS1-donor был клонирован фрагмент ДНК, кодирующий программируемую нуклеазу AsCas12a (AsCpf1) (узнающую PAM

5'TYCV3', имеющую сигналы ядерной локализации nucleoplasmin NLS на С-конце и SV40 NLS на N-конце) из плазмиды pAsCpf1(TYCV)(BB) (pY211) (Addgene plasmid # 89352; <http://n2t.net/addgene:89352>; RRID: Addgene_89352) (Gao et al., 2017). В последовательность нуклеазы AsCpf1 (TTTV) был внесен сайт полиаденилирования SV40poly(A) и эпитоп 3XHA (рис. 1а).

Внесение трансгенных последовательностей ДНК, кодирующих программируемые нуклеазы AsCpf1(TYCV), AsCpf1(TTTV) и трансген обратного доксициклин-зависимого транскриптора M2rtTA в локус AAVS1 генома ИПСК здорового донора

Клетки линии ICGi022-A культивировали на слое эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) в среде KnockOut DMEM ("Thermo Fisher Scientific", США) с добавлением 15% KnockOut Serum Replacement ("Thermo Fisher Scientific", США), 0.1 мМ NEAA ("Thermo Fisher Scientific", США), 2 мМ Glutamax ("Thermo Fisher Scientific", США), 100 мкг/мл Penicillin/Streptomycin ("Thermo Fisher Scientific", США), и 10 нг/мл bFGF ("Sci-Store", Россия). ЭФМ культивировали в среде DMEM/F-12 ("Thermo Fisher Scientific", США) с добавлением 10% FBS ("Thermo Fisher Scientific", США), 2 мМ Glutamax и 100 мкг/мл Penicillin/Streptomycin. ИПСК пересаживали в соотношении 1 : 10 раз в 3–5 дней с помощью TrypLE ("Gibco", США) в культуральную среду, содержащую 2 мкМ Thiazovivin (ингибитор киназы RHO, "Sigma"). За 24 ч до трансфекции клетки пересаживали 1 : 3. В день трансфекции клетки обрабатывали раствором TrypLE, ресуспендировали до одноклеточного состояния в буфере PBS ("Биолот", Россия), пропускали через клеточное сито с диаметром пор 70 мкм ("Miltenyi Biotec", США), центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Трансфекцию проводили на приборе Neon Transfection System ("Thermo Fisher Scientific", США) согласно инструкции производителя, используя программу 1100 В, 30 мс, 1 импульс. На одну реакцию трансфекции объемом 100 мкл брали 4–5 × 10⁵ клеток и 1.5 мкг каждой из плазмид: pX458-AAVS1, AAVS1-Neo-M2rtTA и pAAVS1-AsCpf1(TTTV)-2NLS (или pAAVS1-AsCpf1(TYCV)). Плазмида pX458-AAVS1, кодирующая нуклеазу Cas9 и направляющую РНК в локус AAVS1, была сконструирована на основе pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene plasmid # 48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138) (Ran et al., 2013). Донорная плазмида AAVS1-Neo-M2rtTA, кодирующая обратный транскриптор для доксициклин-управляемой экспрессии и ген устойчивости к неомицину, была получена из депозитария Addgene (Addgene plasmid # 60843; <http://n2t.net/addgene:60843>; RRID: Addgene_60843) (DeKelver et al., 2010) (рис. 1б). После электропорации клетки переносили на слой

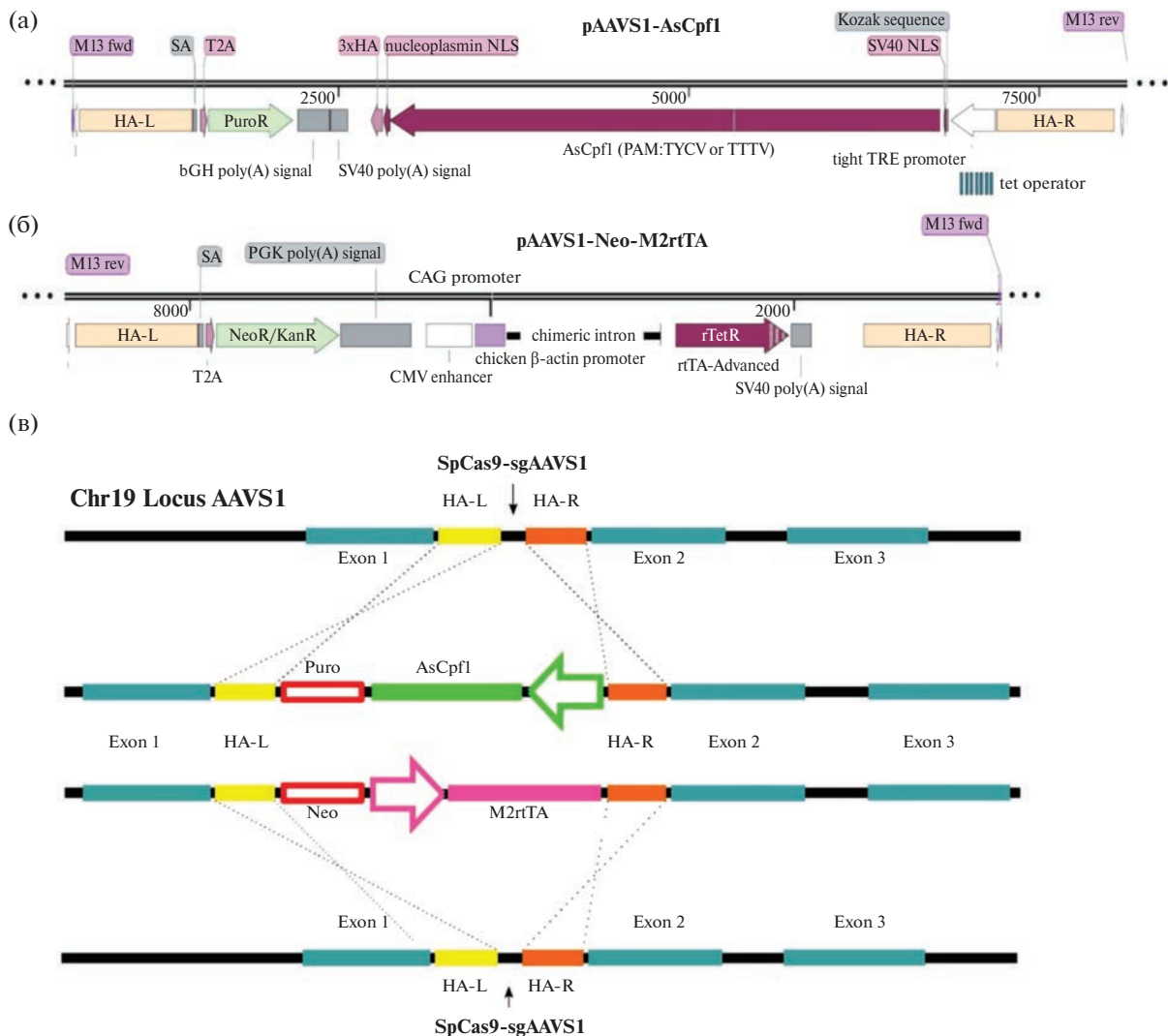


Рис. 1. (а) Схема донорных конструкций pAAVS1-AsCpf1, кодирующих нуклеазу AsCas12(Cpf1), распознающую PAM:5'TTTV3' (pAAVS1-AsCpf1(TTTV)-2NLS) и PAM:5'TYCV3' (pAAVS1-AsCpf1(TYCV)). AsCpf1 – последовательность, кодирующая нуклеазу; PuroR – ген устойчивости к пурамицину; SV40 NLS и nucleoplasmin NLS – сигналы ядерной локализации; HA-L – левое плечо гомологии к локусу *AAVS1*; HA-R – правое плечо гомологии к локусу *AAVS1*; tight TRE promoter – тетрациклин(доксикайлин)-чувствительный промотор; 3×HA тройной гемагглютининовый эпитоп; SA – сигнал сплайсинга; T2A – последовательность 2A-пептида; bGH poly(A) signal – сигнал полиаденилирования; SV40 poly(A) signal – сигнал полиаденилирования. (б) Схема донорной конструкции, кодирующей трансген обратного доксициклин-зависимого трансаактиватора M2rtTA (rTetR) под управлением CAG промотора, ген устойчивости к неомицину (NeoR/KanR), плечи гомологии к локусу *AAVS1*. (в) Схема трансгенеза в локусе *AAVS1*.

митотически инактивированных фибробластов в среду для культивирования ИПСК без антибиотика в присутствии 2 мкМ Thiazovivin ("Sigma-Aldrich", США).

Перед проведением эксперимента по внесению трансгенных конструкций, кодирующих гены устойчивости к пурамицину и неомицину в ИПСК ICGi022-A, были подобраны концентрации антибиотиков G418 (неомицин, "Sigma-Aldrich", США) 50 мкг/мл и пурамицин ("Sigma-Aldrich", США) 200 нг/мл, при которых все клетки погибали постепенно в течение 4х суток. Через

48 ч после трансфекции проводили селекцию G418 (50 мкг/мл) 72 ч в культуральной среде без пенициллина-стрептомицина. Через 24 ч после отмены G418 проводили селекцию клеток на устойчивость к пурамицину (200 нг/мл, 3–4 дня). Устойчивые к антибиотикам колонии ИПСК механическим способом переносили на лунки 48-ячеечного планшета. После достижения культурой плотности более 80% клетки пересевали в соотношении 1:8–10 на лунки 24-ячеечного планшета, из оставшейся части клеток выделяли ДНК и проводили ПЦР-скрининг. Для активации экспрессии

нуклеазы AsCas12a в среду добавляли доксициклин 2 мкг/мл (“Sigma-Aldrich”, США).

Выявление рекомбинантных клонов при помощи ПЦР

Геномную ДНК из клеток выделяли при помощи реагента Quick Extract DNA Extraction Solution (“Lucigen”, США) по протоколу производителя и хранили при -20°C . Амплификацию ДНК проводили с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (“Биолабмикс”, Россия) по протоколу производителя. Для выявления рекомбинантных клонов клеток, в которых произошла CRISPR-опосредованная встройка трансгена в целевой сайт локуса *AAVS1*, были использованы праймеры, указанные в табл. 1.

Вестерн-блот анализ

Клетки лизировали в буфере RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) (“AppliChem”, Германия), 150 mM NaCl (“AppliChem”, Германия), 1 mM ЭДТА (“AppliChem”, Германия), 1% Igepal (“AppliChem”, Германия), 1% дезоксихолат натрия (“AppliChem”, Германия), 10% додецилсульфат натрия (“AppliChem”, Германия)) в течение 30 мин при 4°C с постоянной ротацией, затем центрифугировали 20 мин на 12000 g при 4°C и отбирали супернатант в охлажденные центрифужные пробирки (“Ахуген”, США). Для анализа использовали 40 мкг образца. Электрофорез проводили в 10% полиакриламидном геле в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra (“Bio-Rad”, США) в течение 30 мин при напряжении 100 В, затем 1 ч при 180 В. Белки переносили на мембрану PVDF (“Bio-Rad”, США) в камере для переноса Criterion Blotter (“Bio-Rad”, США) в буфере, содержащем 25 mM Tris-base (“AppliChem”, Германия), 190 mM глицин (“AppliChem”, Германия), 10% метанол (“Союзхимпром”, Россия), в течение 2 ч при силе тока 200 мА. После переноса мембрану инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в блокирующем буфере, содержащем 5% сухое молоко и 0.1% Tween 20 при 4°C ночь, затем со вторичными антителами (табл. 1), меченными HRP (пероксидазой хрена) 60 мин при комнатной температуре. Для проявления пероксидазной активности использовали набор Clarity Max Western ECL Substrate (“Bio-Rad”, США).

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмами и наличия эписом в линиях ИПСК проводили с помощью ПЦР. Программы: $95^{\circ}\text{C} - 3$ мин; 35 циклов: $95^{\circ}\text{C} - 15$ с, $67^{\circ}\text{C} - 15$ с, $72^{\circ}\text{C} - 20$ с; $72^{\circ}\text{C} - 5$ мин (микоплазмы) и $95^{\circ}\text{C} - 5$ мин; 35 циклов:

$95^{\circ}\text{C} - 15$ с, $62^{\circ}\text{C} - 15$ с, $72^{\circ}\text{C} - 15$ с; $72^{\circ}\text{C} - 5$ мин (эписомы). Праймеры указаны в табл. 1.

Анализ нецелевой активности системы CRISPR/Cas9

Участки ДНК, фланкирующие предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9, амплифицировали с помощью ПЦР на приборе GeneExplorer GE-48DG (“Bioer”, КНР) с реагентом Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (“New England Biolabs”, США). Программа: $98^{\circ}\text{C} - 30$ с; 35 циклов: $98^{\circ}\text{C} - 10$ с, $60^{\circ}\text{C} - 30$ с, $72^{\circ}\text{C} - 15$ с; $72^{\circ}\text{C} - 2$ мин. Использованные праймеры приведены в табл. 1. Реакции секвенирования по Сэнгеру выполняли с использованием Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) и анализировали в ЦКП “Геномика” СО РАН на генетическом анализаторе ABI 3130XL.

Анализ кариотипа

Кариотипирование проводили, как описано ранее (Grigor'eva et al., 2020).

Спонтанная дифференцировка ИПСК in vitro

После достижения культурой плотности более 90% ИПСК обрабатывали 0.15% раствором коллагеназы IV типа (“Gibco”, США) в течение 20–30 мин при 37°C . Клеточную суспензию промывали средой для культивирования фибробластов, агрегаты клеток переносили на неадгезивный слой 1% агарозы (“VWR”, США) в KnockOut DMEM с добавлением 10% FBS, 100× NEAA, 100× Glutamax, 100× Penicillin/Streptomycin и культивировали 10 дней. Сформированные эмбриоидные тельца переносили на 48-луночные культуральные планшеты (“Nunc”, США), покрытые матриксом Matrigel GFR Basement Membrane Matrix (“Corning”, США), и культивировали в течение еще 14–20 дней.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% формальдегиде (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 10 мин, после отмывки в PBS пермеабелизовали в 0.5% Triton-X100 (“VWR”, США) в течение 30 мин и блокировали 1% BSA в PBS (“VWR”, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. Первичные антитела инкубировали 16 ч при 4°C , а вторичные антитела инкубировали 1.5–2 ч при комнатной температуре. Антитела разводили в 1% BSA в PBS. Для окрашивания ядер использовали DAPI (“Sigma-Aldrich”, США). Изображения получены на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E с помощью про-

Таблица 1. Антитела, праймеры и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Mouse IgG2b anti-OCT3/4	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, sc-5279	RRID:AB_628051
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 200	ReproCELL, RCAB003P	RRID:AB_2714012
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Rabbit IgG anti-NF200	1 : 1000	Sigma N4142	RRID:AB_477272
	Mouse IgG2a anti- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Mouse IgG1 anti-CK18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
Western блот анализ	Mouse IgG3 anti-HA	1 : 5000	Merck Millipore, 05-904	RRID:AB_417380
	Rabbit IgG anti- β -actin	1 : 3000	Abcam ab8227	RRID:AB_2305186
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L), HRP	1 : 5000	Jackson ImmunoResearch 115-035-003	RRID:AB_10015289
	Goat anti Rabbit IgG (H + L), HRP	1 : 5000	Jackson ImmunoResearch 115-035-144	RRID:AB_2307391
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	Thermo Fisher Scientific, A11078	RRID:AB_2534122
	Goat Anti-Chicken IgY H&L, Alexa Fluor 488	1 : 400	Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653

Таблица 1. Продолжение

	Праймеры и олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	ORIP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Макеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>NANOG</i>	116 пн	TTTGTGGGCCTGAAGAAAAC/ AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
	<i>SOX2</i>	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	<i>ACTB</i>	93 пн	GCACAGAGCCTCGCCTT/ GTTGTCGACGACGAGCG
Детекция контаминации микоплазмой	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATAC- CCT/TGCACCATCTGTCACTCTGT- TAACCTC
Детекция аллеля <i>AAVS1</i> <i>PPP1R12C</i> дикого типа, без целевой встройки	AAVS_WT	555 пн	CTCTGGCTCCATCGTAAGCAA/ CCCAAAGTACCCCGTCTCCC
Детекция встройки M2rtTA в локус <i>AAVS1</i>	HA_L-OUT/Neo_in-R	1024 пн	CCGGACCACTTTGAGCTCTAC/ GCCCAGTCATAGCCGAATAG
Детекция встройки AsCas12a в локус <i>AAVS1</i>	HA_L-OUT/Puro_in-R	1022 пн	CCGGACCACTTTGAGCTCTAC/ AGGCGCACCGTGGGCTTGTAC
Детекция наличия дополнительных нецелевых встроек плазмиды pAAVS1-Neo-M2rtTA в геном	M13R/Neo_in-R	1063 пн	CAGGAAACAGCTATGAC/ GCCCAGTCATAGCCGAATAG
Детекция наличия дополнительных нецелевых встроек плазмид pAAVS1-Puro-AsCas12a в геноме	M13F/Puro_in-R	1007 пн	GTAAACGACGGCCAGT/ AGGCGCACCGTGGGCTTGTAC
Последовательность для спейсера в направляющей РНК	Chr19: 5115762-55115782 <i>AAVS1</i> локус, <i>PPP1R12C</i> , экзон 1	20 н	GTCACCAATCCTGTCCCTAG
Предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 для спейсера направляющей РНК Chr19: 5115762-55115782 <i>AAVS1</i> локус, <i>PPP1R12C</i>	Off-target1 Chr5: 3120086-3120066	20 н	CTAGGGACAGCAGTGGTGGC
	Off-target2 Chr3: 52413085-52413105	20 н	CTTACCAGTGCTGTCCCTAG
	Off-target3 Chr15: 71357395-71357415	20 н	GCCACCACTCCTGTCCCTGG
	Off-target4 Chr3: 175397524-175397504	20 н	CTCAGCCTTCCTGTCCCTAG

Таблица 1. Окончание

	Праймеры и олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Анализ предсказанных сайтов нецелевой активности	Off-target1 Chr5: 3120086–3120066	334 пн	ATCTCCACACGGAAAGAGATCTC/ GCGCTCCCTTTACCAATTAACAG
	Off-target2 Chr3: 52413085–52413105	400 пн	AAGAAGGAATGCCAGAGATTGAG/ TGGCACTTTACATGTATTGGCTC
	Off-target3 Chr15: 71357395–71357415	308 пн	AGCCTACTGTAGGACATCTGCAC/ AGCCTCCCCAGTGCCTCAAATAC
	Off-target4 Chr3: 175397524–175397504	342 пн	ACAGGTATAACAGAGGGATTTCG/ AGCTATGTGTGCATTGACCCAG

граммного обеспечения NIS Elements AR (“Nikon”, Япония).

Количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (“ThermoFisher Scientific”, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию 1–2 мкг РНК проводили с использованием ревертазы M-MuLV (“Биолабмикс”, Россия). Количественную ОТ-ПЦР выполняли на приборе LightCycler 480 System II (“Roche Diagnostics”, Швейцария) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (“Биолабмикс”, Россия). Программа: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 10 с, 60°C – 1 мин.

Анализ результатов ПЦР в режиме реального времени проводили в программе qbase+, version 3.4, использующей обобщенный метод $\Delta\Delta CT$ с учетом эффективности реакции, определенной на основании построения калибровочной кривой по пяти точкам (разведения матрицы с шагом в 5 раз) (Hellemans et al., 2007). Для определения относительной экспрессии генов плюрипотентности в клетках использовали референсный ген *ACTB*. Данные, полученные для линий ИПСК, нормировали на показатели относительной экспрессии генов плюрипотентности в линии эмбриональных стволовых клеток HuES9.

STR анализ

Аутентификацию линий ИПСК осуществляла компания ООО “Геноаналитика” (<https://www.genoanalytica.ru>) с помощью наборов AmpFISTR Identifier Direct PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN) и прибора 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточных линий

Паспорт и характеристики линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 представлены в табл. 2 и табл. 3.

В результате гомологичной рекомбинации с помощью программируемой нуклеазы SpCas9 (pX458-AAVS1) и донорных плазмидных конструкций pAAVS1-AsCpf1(TTTV)-2NLS (или pAAVS1-AsCpf1(TYCV)) и AAVS1-Neo-M2rtTA в геном клеток ИПСК ICGi022-A в один аллель локуса *AAVS1* были внесены последовательности, кодирующие программируемые нуклеазы AsCas12a (TTTV) (или AsCas12a(TYCV)), а в другой аллель – трансген обратного доксициклин-зависимого трансаактиватора M2rtTA. Карты донорных плазмид и схема трансгенеза представлена на рис. 1.

После нуклеофекции ИПСК и последующей селекции с помощью антибиотиков неомицин (G418) и пурамицин был проведен ПЦР-скрининг устойчивых колоний ИПСК с помощью праймеров (табл. 1), выявляющих последовательности ДНК трансгенов нуклеаз Puro-AsCas12a и трансаактиватора Neo-M2rtTA в *AAVS1* локусе, а также нецелевые встройки донорных плазмид (данные не показаны).

Таким образом, в эксперименте по внесению программируемой нуклеазы AsCas12a, узнающей РАМ 5'TTTV3' в геном ИПСК ICGi022-A (K7-4f) были отобраны клоны K7-4f-N1.3, K7-4f-N1.26 (ICGi022-A-6) и K7-4f-N1.72, а для нуклеазы AsCas12a узнающей РАМ 5' TYCV 3' – клоны K7-4f-Y1.5, K7-4f-Y1.14 и K7-4f-Y1.17 (ICGi022-A-7). На рис. 26 приведены результаты ПЦР анализа, доказывающие наличие трансгенов Puro-AsCas12a и Neo-M2rtTA и в целевом локусе *AAVS1* в клонах K7-4f-N1.26 (ICGi022-A-6) и K7-4f-Y1.17 (ICGi022-A-7).

Для подтверждения доксициклин-зависимой работы трансгенов в ИПСК отобранных клонов в

Таблица 2. Паспорт линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7

Уникальный идентификатор	ICGi022-A-6 ICGi022-A-7
Альтернативное название линии	K7-AsCas12aN1-26 K7-AsCas12aY1-17
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 42 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Генетическая модификация	Да
Вид генетической модификации	ICGi022-A-6: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TTTTV) ICGi022-A-7: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TYCV)
Заболевание	
Ген/локус	Chr19q13.42 AAVS1 локус, <i>PPP1R12C</i>
Метод внесения модификации/используемая сайт-специфическая нуклеаза	Гомологичная рекомбинация, система CRISPR/SpCas9
Способ доставки сайт-специфической нуклеазы	Электропорация плазмидной ДНК рХ458-AAVS1 в ИПСК
Внесенный в клетки генетический материал	ICGi022-A-6: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TTTTV) ICGi022-A-7: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TYCV)
Метод анализа внесенной модификации	ПЦР, Вестерн-блот
Способ оценки нецелевой активности	Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, содержащих пред- сказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионных теллец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Платформа для создания моделей наследственных заболеваний на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и системы CRISPR/Cas12a
Способ культивирования	На слое митотически инактивированных фибробластов
Среда культивирования	KnockOut DMEM (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific)
Кратность посева	1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A-6 https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A-7
Дата паспортизации/депонирования	06/07/2023

Таблица 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека морфология	Рис. 2а
Фенотип	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, SOX2, TRA-1-60, SSEA4	Рис. 2г
	Количественный анализ <i>ОТ-ПЦР в реальном времени</i>	Экспрессия маркеров плюрипотентности: OCT4, NANOG, SOX2 на уровне рефересной ЭСК линии HuES9	Рис. 2в
Генотип	Кариотипирование	46,XX Разрешение 450–500	Рис. 3б
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с исходной линией ICGi022-A	Данные доступны по запросу у авторов
Анализ внесенной генетической модификации	ПЦР, Вестерн-блот с антителами на НА-эпитоп	Наличие продуктов ПЦР, соответствующих ожидаемой длине 1022 п.н. (AsCas12a) и 1024 п.н. (M2rtTA); наличие белковых бендов ожидаемой молекулярной массы (157.8 кДа) в образцах полученных при добавлении в культуральную среду доксициклина	Рис. 2б, 2д
Анализ нецелевой активности	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 4 предсказанных сайтах	Рис. 4
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 2е
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: NF200 (эктодерма); αSMA и CK18 (энтодерма)	Рис. 3а
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

среду для культивирования добавляли доксициклин в концентрации 2 мкг/мл и через 24 ч собирали клетки для проведения Вестерн-блота. В качестве контроля брали образцы из ИПСК исходной линии ICGi022-A (K7-4f), а также из необработанных доксициклином трансгенных линий ИПСК. Для выявления экспрессии белка AsCas12a использовали антитела к искусственно-

му эпитопу НА, который находится на С-концах белков.

В результате было обнаружено, что в двух из трех клонов с трансгеном AsCas12a(TTTV) и во всех трех клонах с трансгеном AsCas12a(TYCV), культивируемых в присутствии доксициклина при проведении Вестерн-блот анализа с антите-

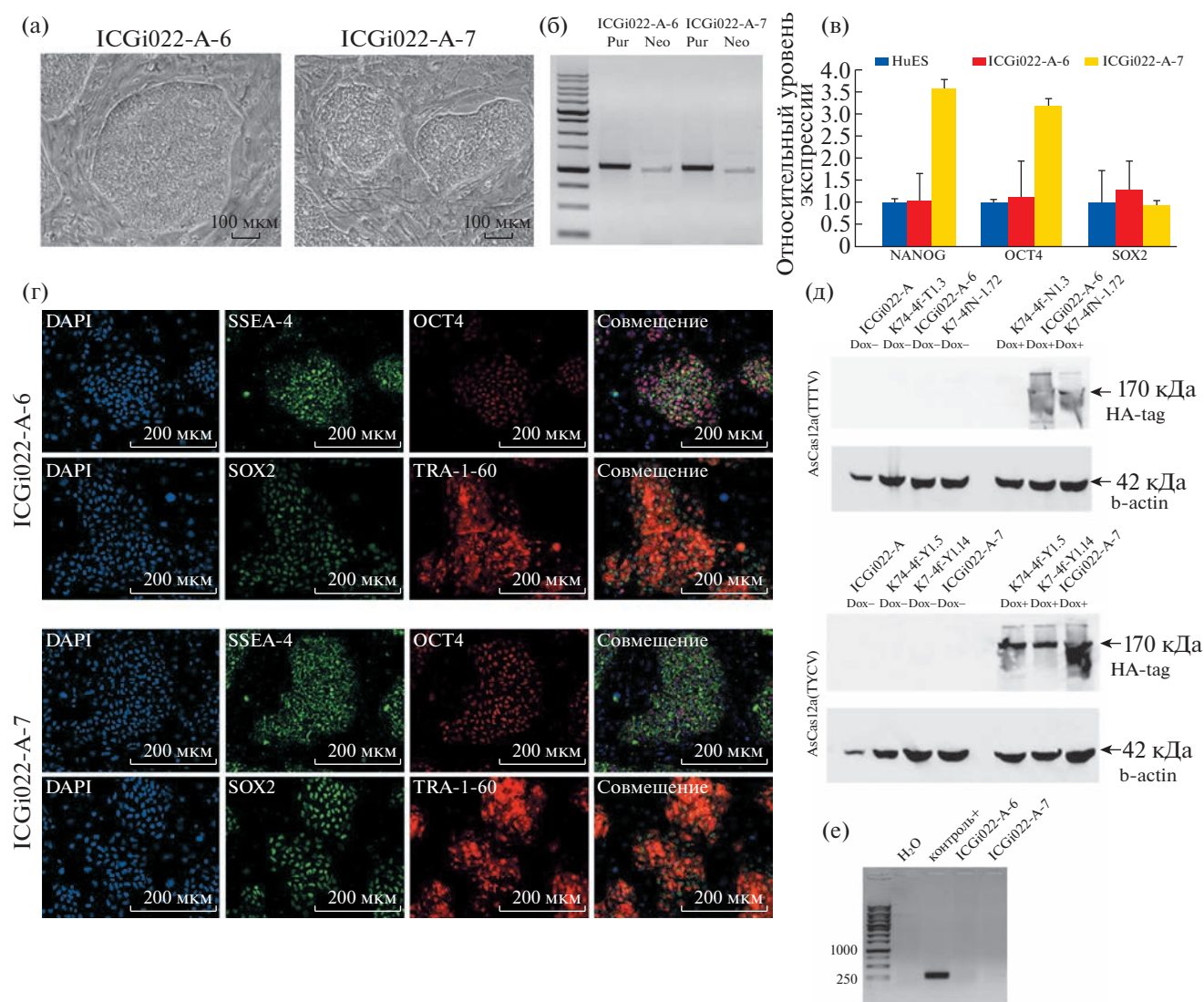


Рис. 2. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, несущих в локусе *AAVS1* доксициклин-управляемые трансгены двух вариантов нуклеазы AsCpf1, распознающих консенсусы РАМ 5'-TTTV-3' и 5'-TYCV-3'. (а) Морфология клеток линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, растущих на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. (б) ПЦР-анализ наличия трансгенов Neo-M2rtTA (Neo) и Puro-AsCpf12a (Pur) в геномах линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, ДНК маркер Sky-High ("Биолабмикс", Россия). (в) Уровень экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) в ИПСК линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 относительно уровня экспрессии генов линии ЭС клеток HuES9. (г) Иммунофлуоресцентная окраска клеток линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 на маркеры плюрипотентности OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA-4 (зеленый), TRA-1-60 (красный). (д) Вестерн-блот анализ экспрессии белков AsCpf1, (несущих 3×HA тройной гематоглининовый эпитоп) в отсутствии и присутствии доксициклина (Dox-/Dox+) с помощью антител, выявляющих гематоглининовый эпитоп (HA-tag), (внутренний позитивный контроль с антителами на бета-актин (b-actin)); линии ИПСК с внесенной нуклеазой AsCpf1(TTTV) – K7-4f-N1.3, ICGi022-A-6 (K7-4f-N1.26), K7-4f-N1.72; линии ИПСК с внесенной нуклеазой AsCpf1(TYCV) – K7-4f-Y1.5, K7-4f-Y1.14, ICGi022-A-7 (K7-4f-Y1.17). ИПСК ICGi022-A – исходная линия, не несущая трансгенов AsCpf1. (е) ПЦР-тест на контаминацию линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 микоплазмой.

лами к HA-эпиту выявляются белки ожидаемого молекулярного веса 157.8 кДа (рис. 2д). В контрольных образцах трансгенных ИПСК, культивированных без добавления доксициклина, и исходной ИПСК данные белки не выявляются. Таким образом, было показано, что система экс-

прессии программируемых нуклеаз в трансгенных клонах ИПСК человека является доксициклин-зависимой. По данным ПЦР-скрининга и Вестерн-блот анализа для дальнейшей работы и регистрации в базе данных Human Pluripotent Stem Cell Registry (<https://hpscreg.eu/>) были вы-

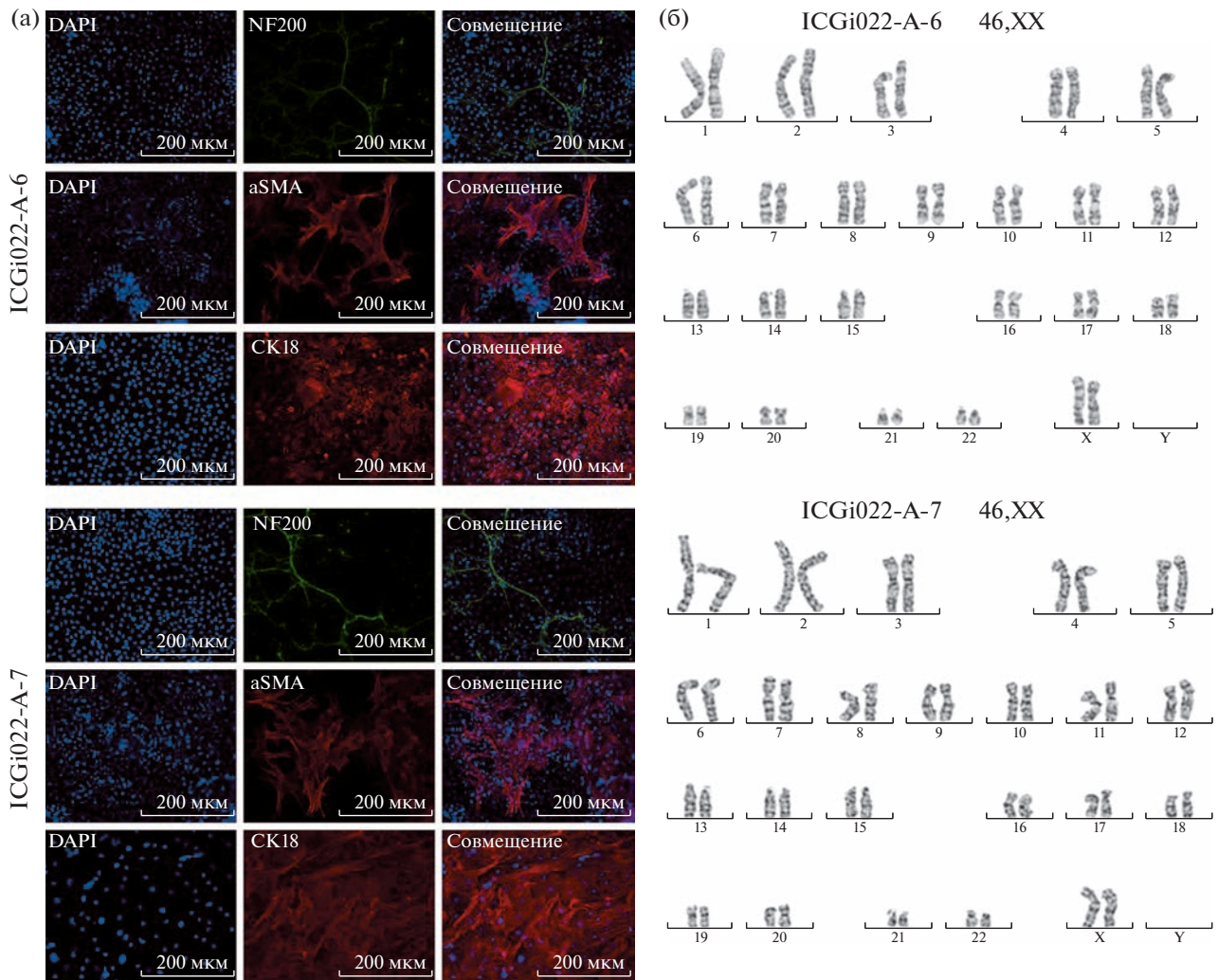


Рис. 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7. (а) Иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (NF200), мезодермы (α -актин гладких мышц (α SMA), энтодермы (цитокератин 18 (CK18)). (б) Анализ кариотипа линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7.

браны клоны K7-4f-N1.26 и K7-4f-Y1.17, которые были зарегистрированы под номерами ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 соответственно.

Во время экспериментов по трансгенезу ИПСК подвергались воздействию на геномы, клонированию и множественному пассированию. В связи с этим необходимо было подтвердить, что трансгенные клоны ИПСК сохранили плюрипотентный статус. Было показано, что полученные трансгенные клоны демонстрируют характерную для плюрипотентных стволовых клеток человека морфологию (рис. 2а). С помощью обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени была проанализирована экспрессия основных генов системы поддержания самообновления плюрипотентных клеток — *NANOG*, *OCT4* и *SOX2*. Было показано, что во всех клонах трансгенных ИПСК наблюда-

ется высокий уровень транскрипции данных генов, сравнимых с уровнем экспрессии в эмбриональных стволовых клетках человека (линия HUES9, Cowan et al., 2004) (рис. 2в).

Кроме того, был проведен иммуноцитохимический анализ экспрессии белков-маркеров самообновления — транскрипционных факторов *OCT4* и *SOX2*, а также поверхностных антигенов *SSEA-4* и *TRA-1-60* (рис. 2г). Данный анализ показал наличие специфического и равномерного окрашивания клеток.

Кроме того, необходимо было доказать, что полученные ИПСК могут образовывать дифференцированные производные трех примитивных зародышевых листков, которые используют при моделировании и исследовании заболеваний на специфических типах клеток. Спонтанная дифференцировка трансгенных клонов ИПСК была

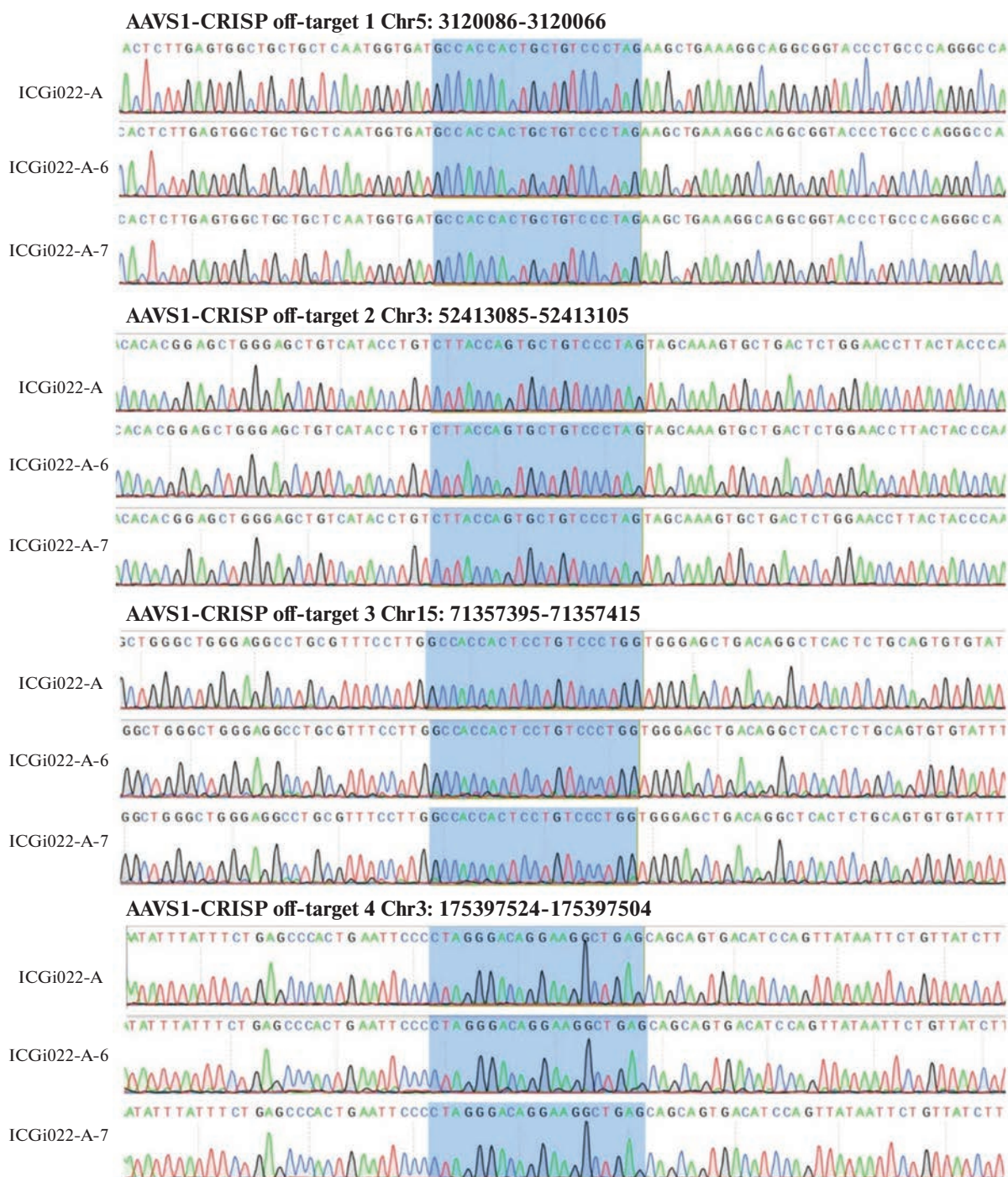


Рис. 4. Анализ нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в геномах линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7.

проведена в эмбрионидных тельцах с последующим иммуноцитохимическим анализом клеток (рис. 3а). Было показано, что при спонтанной дифференцировке трансгенных клонов образуются производные ИПСК, экспрессирующие маркеры эктодермы (NF200), мезодермы (α SMA) и энтодермы (CK18).

Полученные линии ИПСК кариотипически стабильны, G-бэндинг линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 показал, что клетки сохраняют нормальный кариотип – 46,XX (рис. 3б).

С помощью секвенирования по Сэнгеру в геномах полученных линий ИПСК ICGi022-A-6 и

ICGi022-A-7 было продемонстрировано отсутствие событий редактирования генома в 4 наиболее вероятных нецелевых сайтах программируемой нуклеазы SpCas9, предсказанных с помощью ресурса Benchling (<https://www.benchling.com/>) (рис. 4).

Таким образом, в данной работе были впервые получены ИПСК человека, несущие доксициклин-управляемые трансгены программируемых нуклеаз AsCas12a(TTTV) и AsCas12a(TYCV). Полученные трансгенные клоны ИПСК могут быть использованы как клеточная платформа для моделирования наследственных заболеваний человека на основе релевантных дифференцированных производных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания проводили с использованием ресурсов ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWN-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ “Федеральный центр нейрохирургии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациентом было дано добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.В. Павлова, С.М. Закиян и С.П. Медведев: дизайн эксперимента, анализ полученных данных и написание статьи. С.П. Медведев и А.И. Шевченко: создание донорных конструкций, несущих трансгены AsCas12a. К.Р. Валетдинова и Т.Б. Маланханова: трансгенез ИПСК с помощью системы CRISPR/Cas9 и донорных конструкций, отбор клонов ИПСК, устойчивых к неомицину и пурамицину, анализ ДНК клонов на наличие встройки трансгена методом ПЦР и Вестерн-блот. Д.Е. Полищев и А.А. Малахова, Е.В. Григорьева: характеристика полученных в результате редактирования линий ИПСК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Медведев С.П., Маланханова Т.Б., Валетдинова К.Р., Закиян С.М. Создание и исследование клеточных моделей наследственных нейродегенеративных заболеваний с помощью направленного редактирования геномов // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 4. С. 313–319.
- Устьянцева Е.И., Медведев С.П., Ветчинова А.С. и др. Платформа для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически кодируемых биосенсоров // Биохимия. 2019. Т. 84. № 3. С. 423–435.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
- DeKaveler R.C., Choi V.M., Moehle E.A. et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome // Genome Res. 2010. V. 20. № 8. P. 1133–1142.
- Gao L., Cox D.B.T., Yan W.X. et al. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. № 8. P. 789–792.
- Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // Cytotechnology. 2020. V. 72. P. 649–663.
- Hellemans J., Mortier G., De Paepe A. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data // Genome Biol. 2008. V. 8. P. R19.
- Kim D., Kim J., Hur J.K. et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 8. P. 863–868.
- Kleinstiver B.P., Tsai S.Q., Prew M.S. et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 8. P. 869–874.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // Stem Cell Res. 2020. V. 48. P. 101952.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // Nat. Protoc. 2013. V. 8. № 11. P. 2281–2308.
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // Cell. 2015. V. 163. № 3. P. 759–771.

Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a

S. V. Pavlova^{1, 2, 4}, K. R. Valetdinova¹, T. B. Malankhanova¹, D. E. Polivtsev^{1, 3}, A. A. Malakhova^{1, 2, 4}, E. V. Grigor'eva^{1, 2, 4}, A. I. Shevchenko^{1, 2, 4}, S. M. Zakian^{1, 2, 4}, and S. P. Medvedev^{1, 2, 4, *}

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

²Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, 630055 Russia

³Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Genome editing in human pluripotent stem cells using programmable nucleases makes it possible to create models of hereditary pathologies using directed transgenesis, gene knockout, and replacement of individual nucleotides in DNA sequences. Using CRISPR/SpCas9-mediated homologous recombination at the AAVS1 locus, clones of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) ICGi022-A (Malakhova et al., 2020) were obtained, which carry transgenes of two variants of the nuclease AsCas12a (also known as AsCpf1), recognizing different PAM consensuses, and the reverse doxycycline transgene-dependent transactivator – M2rtTA. For each AsCas12a variant, the lines ICGi022-A-6 (AsCas12a, PAM 5'-TTTV-3') and ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3') were obtained. Using Western blot analysis, it was shown that the addition of doxycycline to the culture medium causes activation of the expression of AsCas12a(TTTV) and AsCas12a(TYCV) proteins. The resulting transgenic iPSC clones were subjected to molecular and cytogenetic analysis. Using quantitative PCR and immunocytochemical analysis, it was shown that they have a high level of mRNA expression of gene markers of pluripotent cells, namely *OCT4*, *NANOG* and *SOX2*, as well as specific expression of protein marker OCT4, SOX2, SSEA-4 and TRA-1-60. In addition, using iPSCs spontaneous differentiation into embryoid bodies, it was found that transgenic clones can give derivatives of all three primitive germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. Cytogenetic analysis showed that transgenic iPSC clones have a normal karyotype, 46,XX.

Keywords: induced pluripotent stem cells (iPSCs), transgenesis, CRISPR/Cas9 system, AsCas12a (AsCpf1) nuclease, isogenic cell lines