

ПОНОМАРЦЕВ

Сергей Вячеславович

**АЛЬФОИДНАЯ^{Tet^O}-ИСКУССТВЕННАЯ ХРОМОСОМА ЧЕЛОВЕКА КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
ВЕКТОР ДЛЯ ВНЕСЕНИЯ ТРАНСГЕНОВ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ И
ЧЕЛОВЕКА.**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, член-корр. РАН
Томилин Алексей Николаевич
заведующий лабораторией Молекулярной
биологии стволовых клеток
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской
академии наук, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: Доктор медицинских наук
Павел Андреевич Дыбан
Ведущий научный сотрудник отдела молекулярной
генетики Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Институт экспериментальной
медицины, Санкт-Петербург

Кандидат биологических наук
Галкина Светлана Анатольевна
доцент кафедры генетики и биотехнологии Санкт-
Петербургского Государственного университета, Санкт
Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения Российской
академии наук», Новосибирск

Защита диссертации состоится 12 февраля 2021 г. в 12 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: <http://www.incras.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
<http://www.incras.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.С. Божокина

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность работы.

Для доставки генов в клетки используют генетические экспрессионные векторные конструкции. На сегодняшний день разработано довольно большое количество различных генетических векторов. Все они обладают как преимуществами, так и недостатками. С помощью векторов на основе бактериальных плазмид можно доставлять в клетку ДНК размером до 20 т.п.о. Плазмиды находятся в клетке в эписомальном состоянии, что в случае доставки таких конструкций в делящиеся клетки эукариот, приводит к разбавлению экспрессии трансгена, а затем и к их утрате. Существуют также векторные системы на основе вирусных генетических последовательностей. Для создания таких векторов используют генетические последовательности, как интегрирующихся в геном хозяина вирусов, так и не интегрирующихся. С помощью вирусных векторов можно с высокой эффективностью произвести доставку в клетки генетических элементов длиной до 150 т.п.о. Недостатками вирусных векторных систем являются такие явления, как иммунная реакция организма хозяина на вирусные белки, разбавление экспрессии трансгена в делящихся клетках (для векторов на основе вирусов, генетический материал которых присутствует в клетке хозяина в эписомальном состоянии), риск инсерционного мутагенеза (для векторов на основе вирусов, интегрирующихся в геном хозяина) и эпигенетическое глушение. Существуют также генетические вектора на основе ДНК транспозонов, которые позволяют доставлять в клетки ДНК длиной до 9 т.п.о. Генетические вектора на основе транспозонов встраиваются в геном клетки хозяина, что сопряжено с риском нежелательных последствий, связанных с инсерционным мутагенезом. Для переноса больших фрагментов ДНК в 1983 году была разработана искусственная хромосома дрожжей (YAC – Yeast Artificial Chromosomes). В 1989 году на основе F-плазмиды была разработана бактериальная искусственная хромосома (BAC – Bacterial Artificial Chromosome) и в 1990 году была описана искусственная хромосома на основе ДНК бактериофага P1 (PAC – P1-derived Artificial Chromosome). Конструкции BAC и PAC являются кольцевыми векторами, в которые можно загружать генетические фрагменты длиной до 300 т.п.о. YAC является линейным вектором, в который можно загрузить трансген длиной до 1 млн п. о. При переносе этих искусственных хромосом в клетки высших эукариот, они спонтанно встраиваются в геном хозяина или теряются в процессе клеточных делений. Для переноса длинных генетических фрагментов в клетки высших эукариот и обеспечения ими стабильной экспрессии трансгенов были сконструированы искусственные хромосомы человека (ИХЧ) и искусственные хромосомы мыши (ИХМ). На сегодняшний день разработано достаточно много вариантов таких искусственных хромосом, причём эти векторные системы продолжают совершенствоваться в разных лабораториях (S. A. Sinenko et al., 2020).

Альфоидная^{Tet^O}-ИХЧ является на сегодняшний день одной из наиболее разработанных подобных конструкций (Iida et al., 2010). Несмотря на это, её изучение в плане применения для коррекции генетических заболеваний до сих пор незначительно. С помощью данной ИХЧ, а также индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток мы решили смоделировать на лабораторных мышах терапевтический цикл для моногенного заболевания. Таким заболеванием была выбрана гемофилия А, поскольку существует линия мышей, мутантных по гену фактора свёртывания крови VIII (мутирован при гемофилии А), а сам фактор FVIII является секретлируемым в кровь, что упрощает процесс его детекции у лабораторных животных. На сегодняшний день гемофилия А является очень популярным и удобным объектом для разработки методов генной терапии.

Также мы поставили целью осуществить перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ЭС клетки мыши и в ИПС клетки человека.

Цель и задачи.

Целью работы является изучение возможности переноса альфоидной^{TetO}-ИХЧ в плюрипотентные стволовые клетки человека и мыши и обеспечение экспрессии гена FVIII мышинными FVIII^{-/-} ИПС клетками с помощью альфоидной^{TetO}-ИХЧ.

Задачи:

- 1) Из нокаутных FVIII^{-/-} мышей выделить фибробласты и репрограммировать их в ИПС клетки.
- 2) С помощью методов молекулярного клонирования сконструировать плазмиды для встраивания гена FVIII в альфоидную^{TetO}-ИХЧ.
- 3) Произвести встраивание трансгенов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ.
- 4) Произвести перенос терапевтической альфоидной^{TetO}-ИХЧ в FVIII^{-/-} ИПС клетки мыши.
- 5) Оценить плюрипотентные свойства FVIII^{-/-} ИПС клеток мыши, содержащих терапевтическую альфоидную^{TetO}-ИХЧ, а также уровень экспрессии в них трансгена FVIII.
- 6) Осуществить перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ с трансгеном GFP в ЭС клетки мыши, оценить их плюрипотентные свойства.
- 7) Проверить, возможно ли, используя ЭС клетки мыши с альфоидной^{TetO}-ИХЧ, получить химерных животных.
- 8) Оценить стабильность альфоидной^{TetO}-ИХЧ в полученных клетках.
- 9) Проверить возможность переноса альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС клетки человека.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Альфоидная^{TetO}-ИХЧ не влияет на плюрипотентные свойства мышинных ИПС и ЭС клеток, что в дальнейшем должно позволить дифференцировать модифицированные мышинные ИПС клетки в клетки других тканей.
- 2) С помощью ЭС клеток мыши с альфоидной^{TetO}-ИХЧ возможно получение химерных животных, в тканях которых происходит экспрессия трансгена.
- 3) С помощью альфоидной^{TetO}-ИХЧ можно добиться стабильной экспрессии трансгенов в ИПС клетках мыши.
- 4) Уровень экспрессии одного и того же трансгена, находящегося в альфоидной^{TetO}-ИХЧ зависит от типа клеток, в которых она содержится.
- 5) Альфоидная^{TetO}-ИХЧ является митотически стабильной в ЭС клетках мыши и, по-видимому, в мышинных ИПС клетках.
- 6) Перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС клетки человека возможен с помощью метода ММСТ.

Научная новизна работы.

Впервые произведён перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС и ЭС клетки мыши и ИПС клетки человека, из ЭС клеток мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-ИХЧ впервые получены химерные мыши а также произведена оценка стабильности поддержания данной конструкции в ИПС и ЭС клетках мыши. Данная работа является первой попыткой смоделировать на лабораторных мышах терапевтический цикл лечения моногенного

заболевания (гемофилия А) с помощью пациент-специфичных ИПС клеток и альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ в качестве генетического экспрессионного вектора.

Теоретическое и практическое значение работы.

Данная работа имеет в первую очередь практическое значение, поскольку направлена на изучение возможности использования альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ в качестве вектора в терапевтических целях. Поскольку альфоидная^{Tet^O}-ИХЧ также применяется для исследования таких фундаментальных проблем, как организация центромерного хроматина и стабильность хромосом, её всестороннее изучение также важно и в теоретическом аспекте.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на 4 российских конференциях: междисциплинарный форум Moscow Science Week 2014 (Москва, 2014), IV конференция молодых учёных ИНЦ РАН (СПб, 2014), XVII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» (СПб, 2014) и Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (СПб, 2019), а также на 2 международных конференциях: Skoltech Bio-Med Conference Toward Therapies of The Future (Москва, 2014) и Cell technologies at the edge: research and practice (СТЕРП) (СПб, 2016).

Финансовая поддержка работы.

Работа была выполнена на средства грантов: РФФИ № 13-02-00923 А, № 14-04-31556 мол_а, РФФИ № 14-50-00068 и гранта Санкт-Петербургского Государственного Университета №60257027 (2020 – 2022 гг.).

Объём и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения полученных результатов и списка литературы, содержащего 123 ссылки на первоисточники. Работа изложена на 97 страницах, содержит 24 рисунка и 2 таблицы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки яичников китайского хомячка (линия СНО) выращивали в среде DMEM/F12 (Биолот, СПб, Россия), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), а также 10 мкг/мл бластисидина S (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Мышиные фибробласты, МСК человека и клетки эмбриональной почки человека (линия HEK-293T) растили в среде DMEM (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и 0,25 мкг/мл фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Для культивирования ИПС и ЭС клеток мыши использовали среду knock-out DMEM (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) с добавлением 15% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, раствор набора аминокислот (1:100) (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), 50 мкМ бета-меркаптоэтонола (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), лейкоз ингибирующий фактор (ЛИФ, получен в нашей лаборатории, используется в разведении 1:5000). ИПС клетки растили на чашках, покрытых желатином.

ИПС клетки человека содержали на средах mTeSR-1 (Stemcell Technologies, Ванкувер, Канада) или L7 hPSC BulletKit media (Lonza Group, Базель, Швейцария). Культуральные чашки покрывали матриксом L7 hPSC Matrix (Lonza Group, Базель, Швейцария).

Молекулярное клонирование. Синтез и клонирование в вектор pUC57 кодон-оптимизированной кДНК FVIII производился компанией GenScript (Piscataway, Нью Джерси, США). Эту кДНК (7080 п.о.). FVIII вырезали из вектора pUC57 с помощью ферментов XhoI и NheI (New England Biolabs, Ипсвич, США) и встраивали его по сайтам AvrII и Sall в плазмиду pCMV-tDNA-IL2RG (ранее клонированную в нашей лаборатории на основе вектора tTS-IRES_DsRed2 (Kononenko et al., 2013). Лигирование проводили с помощью лигазы T4 (Евроген, Москва, Россия) согласно фирменной инструкции. Полученный вектор был обозначен как pCMV-tDNA-optFVIII. Локус, содержащий последовательности EF1-альфа и инсультатор cHS4, был вырезан из плазмиды pEF1-alpha-cHS4-IL2RG-DsRed (ранее клонированную в нашей лаборатории на основе вектора tTS-IRES_DsRed2) с помощью фермента NotI, затем, полученный продукт рестрикции длиной 5867 п. о. был обработан фрагментом Клёнова (New England Biolabs, Ипсвич, США) и обработан рестриктазой PacI. Фрагментом длиной 3106 п. о. замещали локус, содержащий цитомегаловирусный промотор (CMV) в плазмиде pCMV-tDNA-optFVIII, после её обработки ферментами NruI и PacI. Полученный вектор был обозначен, как pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII.

Трансфекция клеток линии CHO. Клетки линии CHO, содержащие ИХЧ (CHO 38.18) трансфецировали плазмидой, содержащей ген FVIII и плазмидой pMC-Cre, содержащей ген Cre-рекомбиназы с помощью реактива Липофектамин 2000 (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), согласно фирменной инструкции. Через 48 ч после трансфекции клетки пересеивали на 10 см чашку Петри и добавляли в среду компоненты гипоксантин-аминоптерин-тимидин (НАТ – hypoxanthin-aminopterin-thymidine) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) для отбора клеток, у которых произошла корректная Cre/lox-рекомбинация. GFP-позитивные клеточные клоны отбирали после 10-12 дней культивирования на среде с НАТ и переносили на 96-луночный планшет.

Сборка лентивирусов. Для репрограммирования фибробластов мыши и МСК человека, а также для осуществления переноса ИХЧ с помощью метода ретро-ММСТ были собраны лентивирусы, содержащие гены факторов плюрипотентности: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM), трансактиватора rtTA, а также белковой оболочки вируса мышинной лейкемии – EnvΔR. Для этого в клетки линии HEK-293T были доставлены следующие вектора: pMD2.G, содержащий ген лентивирусного капсида (2,5 мкг), пакующая плаزمида psPAX2 (7,5 мкг) и одна из следующих плазмид: tetO-FUW-OSKM (OSKM), FUW-M2rtTA (rtTA) (Carey et al., 2009), EnvΔR-IRES-TdTomato (T. Suzuki et al., 2016) или pHAGE2-tetO-OKSM (Skvortsova et al., 2018) (10 мкг) с помощью кальций-фосфатной трансфекции или гидрохлорида-полиэтиленимина (PEI – polyethylenimine hydrochloride) (Polysciences, Уоррингтон, США).

Вестерн-блот. Вестерн-блот проводили по протоколу, описанному ранее (Ponomartsev et al., 2020). Использовали следующие первичные антитела: овечьи против белка FVIII (Abcam, Кембридж, США), разведение - 1:250, мышинные против актина (DSHB, Айова Сити, США), разведение – 1:500 и кроличьи против глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) (Cell Signaling, Данверс, США), разведение – 1:1000. Вторичные антитела были конъюгированными с пероксидазой хрена: ослиные антитела против овечьих, козьи антитела против кроличьих и козьи антитела против мышинных (Jackson ImmunoResearch, Уэст Гроув, США), разведение - 1:4000. Мембраны анализировали,

используя субстрат West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) на приборе Chemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Херкулис, США).

Выделение геномной ДНК и ПЦР. Клетки снимали с 24 луночного планшета, лизировали и выделяли из них ДНК с помощью ацетата натрия (Ponomartsev et al., 2020). Для ПЦР использовали фирменный набор HS-Taq PCR-color mix (Биолабмикс, Новосибирск, Россия). Для амплификации фрагмента EF1- α -FVIII использовали праймеры: прямой – 5'-acgtcgtcttaggttgggg-3', обратный – 5'-tcggtgaactccacgaacag-3' (размер ПЦР продукта – 477 п. о.). Плазмида pUC57-optFVIII использовалась в ПЦР реакции в качестве позитивного контроля. Для амплификации гена Cre-рекомбиназы использовали праймеры: прямой – 5'-ccacgaccaagtgacagcaatg-3', обратный – 5'-cagagacggaatccatccatcgctc-3' (размер ПЦР продукта – 373 п. о.). Плазмида pMC-Cre использовалась в ПЦР реакции в качестве позитивного контроля.

Приготовление метафазных пластинок. Клетки выращивали до 80% покрытия 10 см чашки Петри. Затем добавляли в среду к культивируемым клеткам кальцемид (CalyoMAX, Invitrogen, финальная концентрация 0,1 мкг/мл) и продолжали инкубировать клетки ещё 2 ч. Далее готовили препараты метафазных пластинок с помощью 0,56% раствора хлорида калия (Liskovych et al., 2015).

Флуоресцентная гибридизация *in situ*. Для выявления ИХЧ и теломеров на препаратах метафазных пластинок, производили их гибридизацию с зондами PNA-FITC-tetO (ПНК зонд на коровую последовательность альфоидной^{TetO}- ИХЧ) и PNA-TRITS-telomere (ПНК зонд на теломерную последовательность хромосом млекопитающих) (Panagen Company, Бетел, США). Для выявления ИХЧ на препаратах метафазных пластинок, полученных из фибробластов химерных мышей использовали зонды, содержащие альфоидную^{TetO}-ДНК, меченную флуоресцентным красителем Alexa546. Зонды готовили из плазмиды p3.5 (Kononenko et al., 2015), с помощью фирменного набора ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) согласно инструкции.

Флуоресцентную гибридизацию производили по протоколу, описанному ранее (Liskovych et al., 2015; Ponomartsev et al., 2020).

Анализ образцов проводили с помощью микроскопа EVOS Cell Imaging Systems Substrate (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Анализ митотической стабильности альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС и ЭС клетках мыши. ИПС клетки, содержащие терапевтическиую ИХЧ культивировали в присутствии в среде бластисидина в концентрации - 4 мкг/мл в течение 20 дней. Клетки затем культивировали ещё 15 дней в среде без бластисидина, после чего определяли долю EGFP-позитивных клеток с помощью проточного цитофлуориметра, а также оценивали потерю ИХЧ на препаратах метафазных пластинок, анализируя под микроскопом по 30 пластинок на клеточную линию на предмет наличия или отсутствия ИХЧ. Подсчёт индекса потери ИХЧ за день (доля клеток в культуре, теряющих ИХЧ за сутки) производили по формуле, применяемой для данной цели (Pesenti et al., 2018): $N_{15} = N_0 \times (1 - R)^{15}$, где N_{15} – это процент метафазных пластинок, содержащих ИХЧ или процент EGFP-позитивных клеток после культивирования клеток в течение 15 дней в отсутствие бластисидина, N_0 – процент метафазных пластинок или EGFP-позитивных клеток после 20 дней содержания клеток в среде с бластисидином и R – индекс потери ИХЧ за день.

Выделение фибробластов из кончика хвоста мыши. Кончик хвоста мыши, размером около 1 см мелко нарезали с помощью стерильного скальпеля и инкубировали в растворе коллагеназы IV (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) с концентрацией 1 мг/мл в течение 15 мин при температуре +37°C. После промывания фосфатным буфером PBS, ткань инкубировали

в растворе 0,05% трипсина (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) в течение 20 мин при температуре +37°C. Полученный гомогенат культивировали в 6 см чашках Петри на среде для мышинных эмбриональных фибробластов с добавлением фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Репрограммирование фибробластов мыши в ИПС клетки. Для репрограммирования использовали фибробласты, выделенные из кончика хвоста мыши, находящиеся на 3-4 пассажах. В культуральную среду добавляли вирусные частицы tetO-FUW-OSKM и FUW-M2rtTA. Начиная со следующего дня, клетки растили на среде для культивирования мышинных ИПС клеток с добавлением доксициклина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) в концентрации 5 мкг/мл. На четвёртые сутки культивирования клетки снимали с помощью трипсина и переносили на 10 см чашки Петри с фидерными, обработанными митомицином, мышинными эмбриональными фибробластами. После появления отдельных ИПС клеточных клонов их отбирали и культивировали далее в соответствующей среде без добавления доксициклина.

Репрограммирование МСК человека. Для репрограммирования использовались МСК жировой ткани здоровых людей, которые были взяты с их письменного разрешения, согласно клиническому протоколу этического комитета Национального Медицинского Исследовательского Центра имени В. А. Алмазова (номер этического разрешения 12.26.2014). МСК клетки человека репрограммировали с помощью лентивирусных частиц рHAGE2-tetO-OKSM и rtTA по описанному ранее протоколу (Sinenko et al., 2018).

Получение таратом и гистологические срезы. Мышинные ИПС клетки снимали с культуральных чашек с помощью трипсина и вводили подкожно в заднюю ногу мышам линии BALB/c-Nude по 10^6 клеток, разведённых в буфере PBS. Через 3-4 недели мышей забивали, вырезали таратомы. Из таратом готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, как описывали ранее (Ponomartsev et al., 2020). Окрашенные срезы анализировали под микроскопом EVOS Cell Imaging Systems Substrate (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Перенос ИХЧ из клеток линии CHO в ИПС и ЭС клетки мыши и ИПС клетки человека. Перенос ИХЧ осуществляли в ИПС клетки человека и мыши с помощью метода ретроММСТ (Microcell-Mediated Chromosome Transfer) (T. Suzuki et al., 2016) с небольшими модификациями (Liskovykh et al., 2016; S. Sinenko et al., 2018).

Для переноса ИХЧ в ЭС клетки мыши использовали ММСТ протокол, в котором в качестве цитостатика использовали колцемид (Wako Pure Chemical, Осака, Япония) (100 нг/мл), а в качестве агента, дестабилизирующего актиновый цитоскелет – цитохалазин Б. Для обеспечения слияния ЭС клеток и микроклеток использовали набор Neo EX HVJ Envelope Transfection Kit (Cosmo Bio, Токио, Япония)(Liskovykh et al., 2016).

Отбор ИПС клеток мыши с помощью проточной цитофлуориметрии. ИПС клетки мыши, содержащие терапевтическую альфоидную^{TetO}-ИХЧ, выращивали в 6 см чашках Петри, снимали с помощью трипсина, промывали средой DMEM/F12 и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл среды. Клетки, позитивные по флуоресцентному сигналу GFP, регистрировали и отбирали с помощью проточного флуоресцентного сортера EPIX XL (Beckman Coulter, Пасадена, США). Отобранные клетки высевали на 6 см чашки Петри, покрытые желатином, в среду для культивирования ИПС клеток мыши, с добавлением фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки окрашивали с помощью антител, как описывалось ранее (Ponomartsev et al., 2020). Использовали следующие первичные антитела: мышинные антитела против Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) (разведение 1:500), кроличьи антитела против Nanog (Bethyl Laboratories, Монтгомери, США) (разведение 1:1000), мышинные антитела против SSEA1 (Developmental Studies Iowa Hybridoma Bank, Айова, США) (разведение 1:100) и мышинные антитела против Sox2 (NBC, Астана, Казахстан) (разведение 1:500). Использовали вторичные антитела против антител мыши, конъюгированные с флуоресцентным агентом Alexa647 и против антител кролика, конъюгированные с флуоресцентным агентом Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, США). Окрашенные клетки анализировали с помощью микроскопа EVOS Cell Imaging Systems (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Иммуногистохимическое окрашивание. Органы химерных мышей фиксировали в формалине, заключали в парафин и делали из них срезы, так же, как и при работе с тератомами (см. выше). Срезы окрашивали с помощью первичных мышинных антител против белка GFP (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) (разведение 1:200) и вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa488 (Abcam, Кембридж, США) (разведение 1:500) (Liskovykh et al., 2015). Анализ препаратов проводили с использованием микроскопа Axiovert 40 (Zeiss, Оберкохен, Германия).

Получение химерных мышей. Эмбриональные стволовые клетки мыши линии E14, содержащие альфоидную^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ, снимали с культуральных чашек с помощью трипсина, суспендировали в небольшом количестве среды для плюрипотентных стволовых клеток и держали на льду до инъекции в бластоцисты. Эмбрионы извлекали, по ранее описанному протоколу (Porova et al., 2008) из маток 23-25-дневных суперовулированных мышей линии C57BL/6J на 3,5 день после их оплодотворения. В бластоцисту инъецировали по 15-17 ЭС клеток. Далее бластоцисты вводили в матки псевдобеременных мышей линии CB6F1, по 10-12 эмбрионов на самку.

Лабораторные животные. В работе использовали мышей следующих линий: иммунодефицитные мыши – BALB/c-Nude (Питомник лабораторных животных «Пушино», Пушино, Россия), нокаутные по гену фактора свёртывания крови 8 - B6;129S-F8^{tm1Kaz}/J, мыши дикого типа – C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Бар Харбор, США). Эксперименты на мышах проводились в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, подтверждёнными сертификатом OLAWNIH (идентификационный номер – F18-00380, Институт цитологии РАН).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ.

3.1. Сборка векторов для доставки терапевтического гена в альфоидную^{TetO}-ИХЧ.

С помощью методов молекулярного клонирования нами были получены генетические вектора для доставки гена FVIII в альфоидную^{TetO}-ИХЧ (конструкции CMV-tDNA-optFVIII и EF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII) (Рис. 1). Элементы, общие для обеих конструкций – это: точка начала репликации, необходимая для наработки данных векторов в бактериальных клетках; ген устойчивости к ампициллину для отбора на селективной среде бактериальных клонов, содержащих такие плазмиды; сайт loxP для сайт-специфичного встраивания векторных конструкций в альфоидную^{TetO}-ИХЧ; 3' фрагмент гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (HPRT), который после встраивания векторов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ в правильной ориентации, обеспечивает восстановление функциональной формы гена HPRT, что позволяет отбирать клоны клеток линии CHO, нокаутные по гену HPRT, но несущие его восстановленную форму в ИХЧ, на селективной

НАТ среде; ген зелёного флуоресцентного белка GFP под контролем повсеместного промотора CAG, как дополнительный маркер селекции клеток; кДНК гена фактора свёртывания крови VIII; кластеры тДНК в качестве инсуляторов (Ebersole et al., 2011), которые фланкируют гены GFP и FVIII, для предотвращения ингибирующего влияния на транскрипцию трансгенов со стороны центрохроматина, после встраивания векторных конструкций в альфоидную^{TetO}-ИХЧ.

Конструкции различаются между собой по промоторам, контролирующим экспрессию гена FVIII, а именно в векторе pCMV-tDNA-optFVIII – это промотор цитомегаловируса (CMV), а в конструкции pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII – это повсеместный промотор гена альфа субъединицы фактора элонгации 1 человека (EF1-α). Также в конструкции pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII между промоторами генов GFP и FVIII, которые расположены в ориентации «голова к голове» находится дополнительный инсулятор cHS4 куриного β-глобулинового кластера генов, необходимый для разграничения их активности.

Плазмида pCAG-GFP, в которой ген GFP под контролем промотора CAG фланкирован инсуляторами cHS4, была описана ранее (Iida et al., 2010) и любезно предоставлена нам В. Л. Ларионовым (Национальный Институт Здоровья, Бетесда, США).

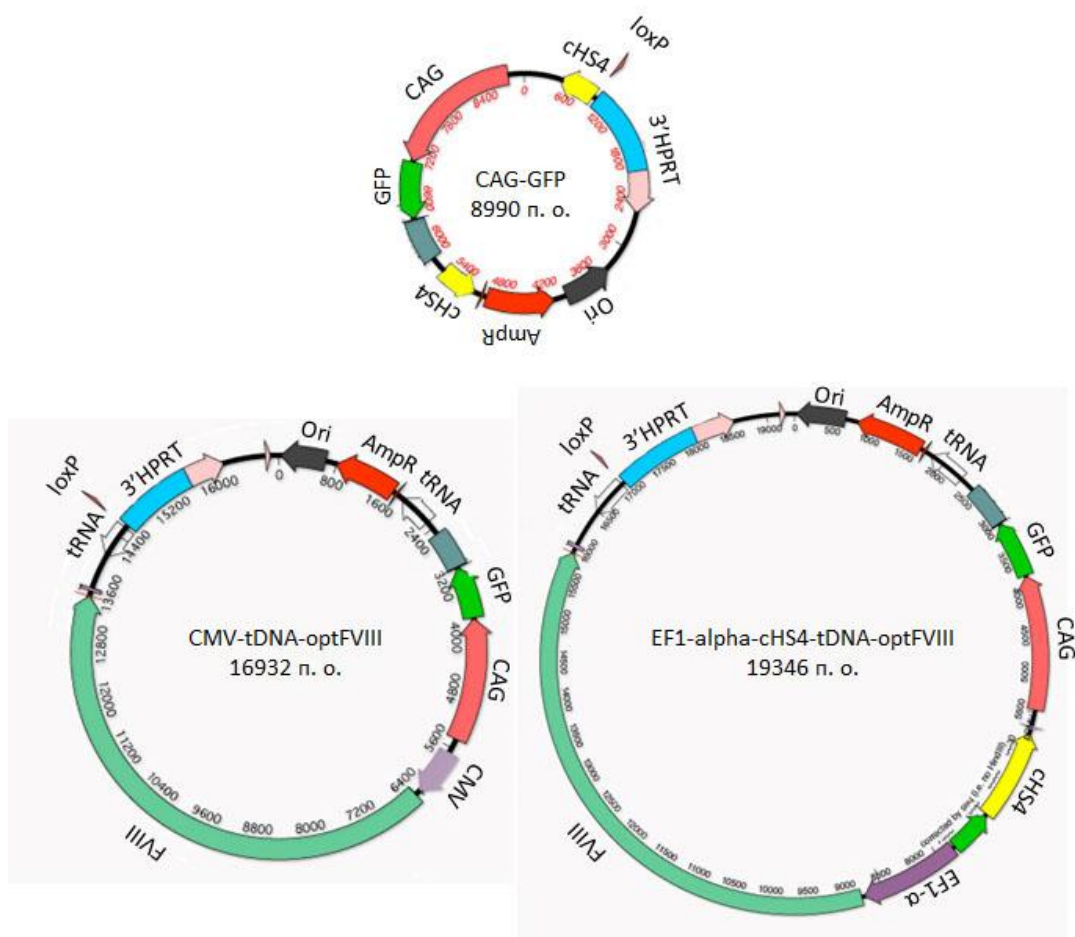


Рисунок 1. Векторные конструкции для встраивания трансгенов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ. Обозначения: Ori – точка начала репликации, AmpR – ген устойчивости к ампициллину, trRNA – кластер генов тРНК, GFP – ген зелёного флуоресцентного белка, CAG – промотор, контролирующий транскрипцию гена GFP, cHS4 – инсулятор, CMV и EF1-α – промоторы, контролирующие транскрипцию гена FVIII, FVIII – кДНК гена фактора свёртывания крови VIII, loxP – сайт для Cre/lox – рекомбинации.

3.2. Встраивание трансгенов в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ с помощью cre/lox-рекомбинации.

Генетические векторные конструкции рCMV-tDNA-optFVIII и EF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII были встроены в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ, находящуюся в HPRT^{-/-} клетках линии CHO, с помощью сайт-специфичной Cre/lox-рекомбинации. Для этого HPRT^{-/-} клетки линии CHO, несущие альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ, были трансфицированы с помощью липофекции вектором рMC-Cre, содержащим ген Cre-рекомбиназы, а также конструкциями рCMV-tDNA-optFVIII или EF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII. При встраивании трансгена в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ в правильной ориентации, происходит соединение 3'-фрагмента гена HPRT, находящегося в векторной конструкции с 5'-фрагментом, находящимся в альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ (Рис. 2). После этого в клетках происходит восстановление функции гена HPRT, что позволяет производить отбор клеточных клонов с корректной вставкой трансгена.

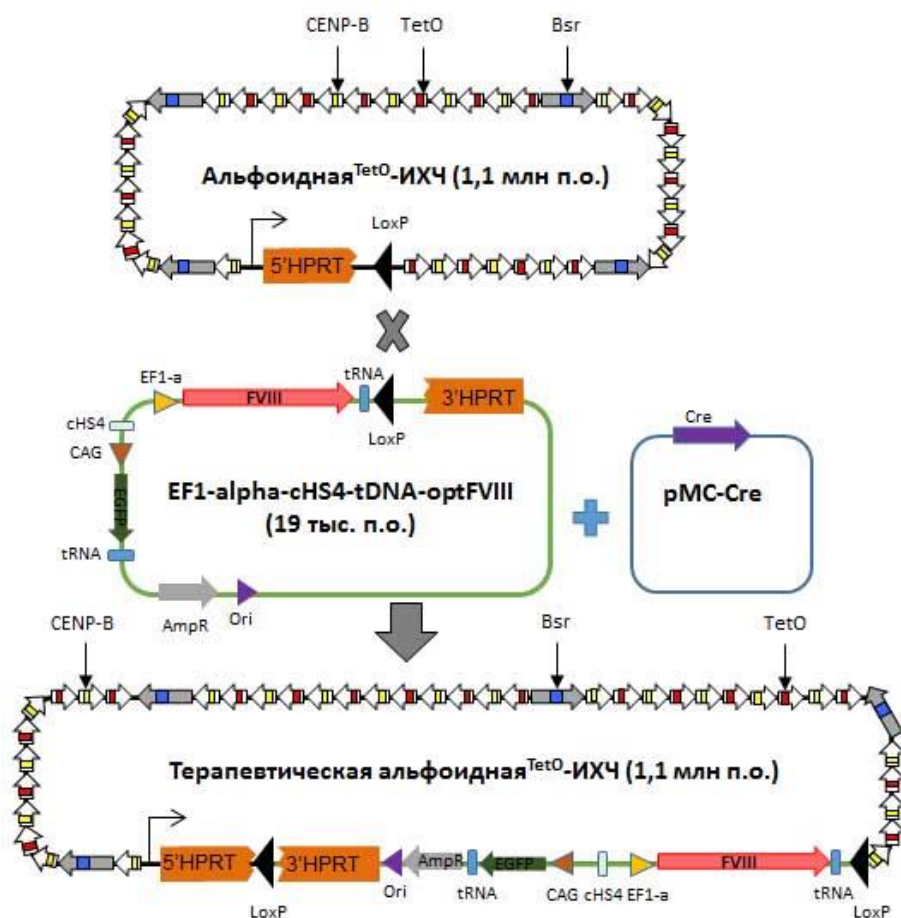


Рисунок 2. Схема встраивания трансгенов в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ. Условные обозначения: белые стрелки с красными и жёлтыми полосками – мономеры альфоидной прицентромерной ДНК, жёлтые полоски - сайты CENP-B, необходимые для сборки кинетохорного комплекса, красные полоски - TetO – тетрациклиновый оператор, Bsr – ген устойчивости к бластисидину, 5'HPRT и 3'HPRT – 5' и 3'-фрагменты гена HPRT, сайт LoxP обозначен чёрными треугольниками, tRNA – кластеры генов тРНК, выполняющие функцию инсуляторов, cHS4 - инсулятор cHS4, FVIII - кДНК гена FVIII, EF1-α - промотор EF1-α, CAG - промотор CAG, ген GFP обозначен зелёной стрелкой, AmpR - ген устойчивости к ампициллину, Ori – точка начала репликации, Cre - ген Cre-рекомбиназы.

После Cre/lox – рекомбинации генетического вектора рEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII и альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ, на селективной NAT-среде нами было отобрано 15 клонов клеток линии CHO, содержащих терапевтическую альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ и позитивных по

флуоресцентному зелёному GFP-сигналу (Рис. 3, в). С образцами ДНК из этих клеточных клонов был проведен ПЦР анализ, который показал наличие в них гена FVIII под контролем промотора EF1- α (Рис. 3, а). Также с помощью ПЦР анализа было показано, что у 3 из 15 клеточных клонов произошло спонтанное встраивание гена Cre-рекомбиназы в геном, что свидетельствовало о непригодности данных клонов для последующих экспериментов (Рис. 3, а). Также были получены лизаты всех 15 клонов и проведён Вестерн-блот анализ, который показал, что в 12 клеточных клонках присутствует белковый продукт гена FVIII (Рис. 3, б). На основании этих данных, а также учитывая темпы роста полученных клеточных клонов в культуре, было отобрано 4 клонка для оценки автономности терапевтической альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Из данных клеточных клонов были получены препараты метафазных пластинок, которые анализировали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Было показано, что во всех четырёх клонках терапевтическая альфоидная^{TetO}-ИХЧ присутствует в одной копии и находится в автономном состоянии (Рис. 3, г). В результате, для дальнейших экспериментов был отобран клон №2, для которого было отмечено наличие гена FVIII под контролем промотора EF1- α , отсутствие в геномной ДНК спонтанно встроенного гена Cre-рекомбиназы, наличие белкового продукта гена FVIII, автономность терапевтической альфоидной^{TetO}-ИХЧ и её присутствие в виде одной копии на клетку, а также устойчиво высокий темп роста в культуре, нормальная клеточная морфология и высокий процент GFP-позитивных клеток.

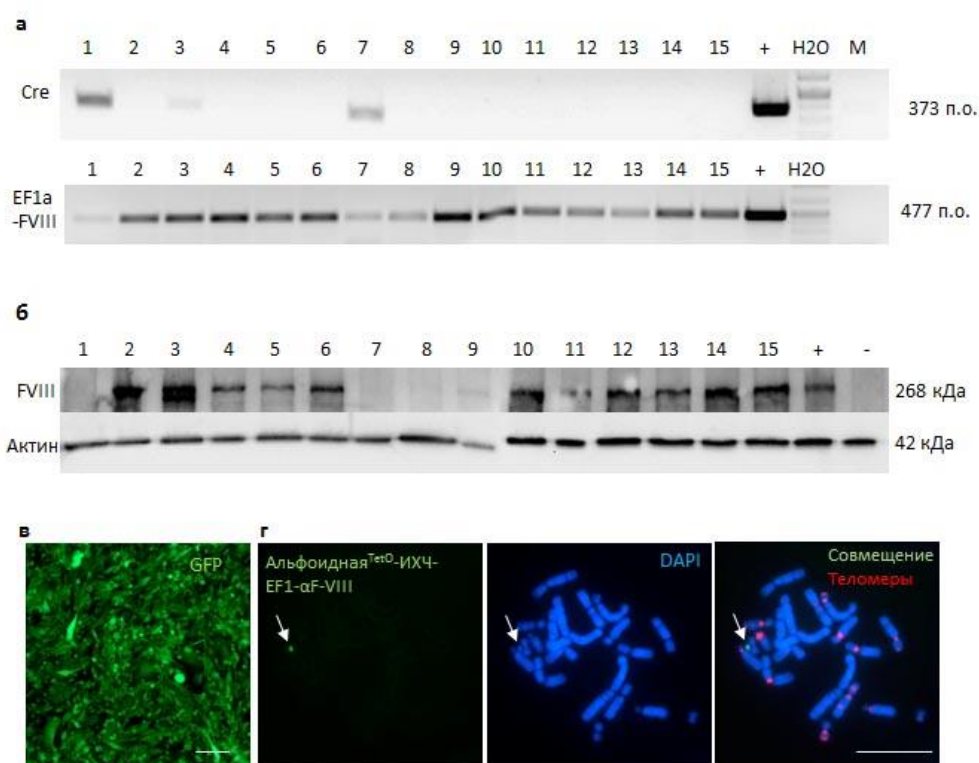


Рисунок 3. Клетки линии CHO с, терапевтической альфоидной^{TetO}-ИХЧ с геном FVIII под контролем промотора EF1- α . **а)** ПЦР анализ клонов клеток линии CHO отобранных на селективной HAT-среде после Cre/lox рекомбинации альфоидной^{TetO}-ИХЧ и вектора EF1-alpha-CHS4-tDNA-optFVIII (сокращённо - клетки CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII). На верхней фотографии геля – амплификация гена Cre-рекомбиназы. Клеточные клоны обозначены цифрами. В качестве позитивного контроля (+) использована плаزمида pMC-Cre. На нижней фотографии геля – амплификация фрагмента трансгена EF1- α -FVIII. В качестве позитивного контроля (+) использована плазмида pEF1-alpha-CHS4-tDNA-optFVIII. **б)** Вестерн-блот анализ на наличие экспрессии гена FVIII в клетках CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII. В качестве отрицательного контроля (-) использовали лизаты клеток исходной линии CHO 38,18, содержащих «пустую» альфоидную^{TetO}-ИХЧ. В качестве позитивного контроля (+) использовали клетки линии CHO 38,18, трансфицированные вектором pUC57-optFVIII. Для контроля нагрузки общего белка, мембрану окрашивали также с помощью антител против

актина. **в)** Флуоресценция GFP клеток CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клон №2) после отбора на селективной NAT-среде. Масштабная линейка – 100 мкм. **г)** FISH анализ препарата метафазных пластинок клеток CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клон №2). Зелёный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфоидной^{TetO}-ИХЧ, красный сигнал – зонд к теломерным последовательностям (у клеток линии CHO данные последовательности локализуются вблизи центромерных участков). Масштабная линейка – 10 мкм.

Также после Cre/lox рекомбинации плазмиды pCMV-tDNA-optFVIII и альфоидной^{TetO}-ИХЧ был отобран клон клеток CHO, содержащий терапевтическую альфоидную^{TetO}-ИХЧ с геном FVIII под контролем промотора CMV.

3.3. Получение ИПС клеток из фибробластов мышей линии нокаутной по гену FVIII.

Для получения ИПС клеток использовали фибробласты, полученные из кончика хвоста мутантных мышей линии, нокаутной по гену FVIII. После выведения таких фибробластов в культуру их трансдуцировали лентивирусными доксициклин-индуцибельными полицистронными конструкциями, содержащими гены Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус (OSKM), а также rtTA-активатор (Carey et al., 2009). Через 16-20 дней после лентивирусной трансдукции были отобраны 8-10 клонов ИПС клеток. Клетки выращивали до необходимого количества и оценивали их рост и морфологию в условиях *in vitro*, экспрессию ими генов факторов плюрипотентности Oct4 и Nanog, а также способность формировать тератомы в бестимусных мышах линии NUDE с тканями всех трёх зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) (Рис. 4). Таким образом нами было отобрано 2 клона ИПС клеток, нокаутных по гену FVIII.

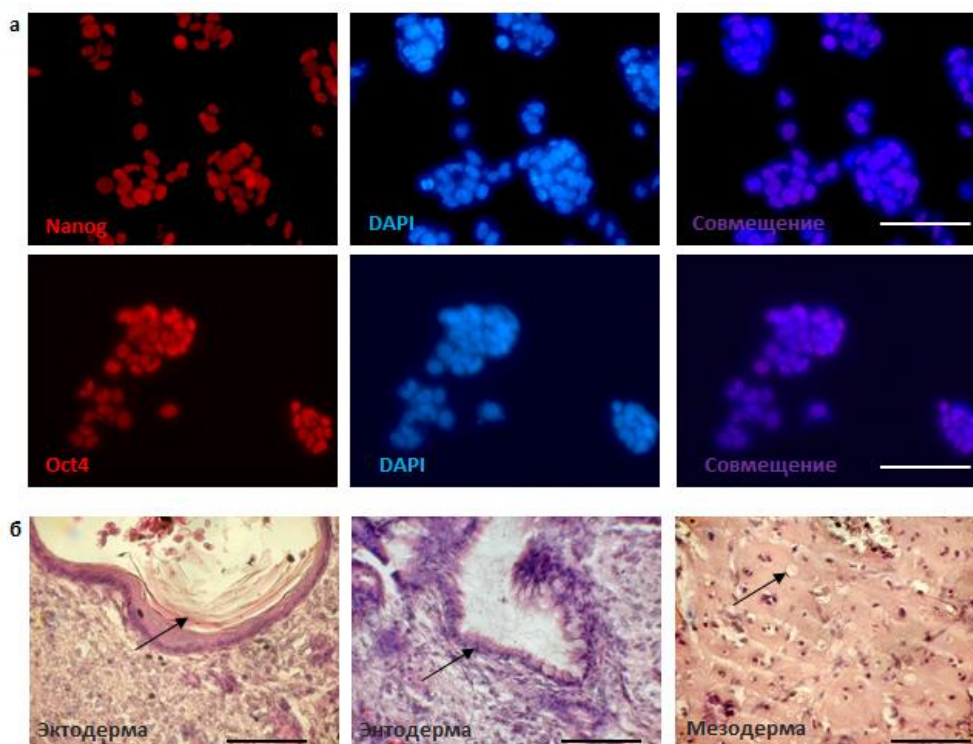


Рисунок 4. Экспрессия генов маркеров плюрипотентности и формирование тератом ИПС клетками (FVIII^{-/-}-ИПС клетками), полученных из фибробластов мышей нокаутных по гену FVIII. **а)** Иммуноцитохимическое окрашивание FVIII^{-/-}-ИПС клеток антителами против белка Nanog (верхний ряд фотографий) и против белка Oct4 (второй ряд). Масштабная линейка – 100 мкм. **б)** Окраска гематоксилином – эозином парафиновых срезов тератом, выращенных из FVIII^{-/-}-ИПС клеток в бестимусных мышах линии NUDE. Стрелками обозначены: кератиновый эпидермис (эктодерма), бокаловидные клетки кишечного эпителия (энтодерма), хрящевые клетки (мезодерма).

3.4. Перенос терапевтической альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ из клеток линии СНО в FVIII^{-/-}-ИПС клетки мыши с помощью метода ММСТ.

Для переноса терапевтической альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ из клеток линии СНО в FVIII^{-/-}-ИПС клетки мыши (клон №2) мы использовали метод ретро-ММСТ (T. Suzuki et al., 2016) с модификациями, используемыми в нашей лаборатории (S. A. Sinenko et al., 2020), а также метод ММСТ (Liskovykh et al., 2016). После переноса альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ в мышинные FVIII^{-/-}-ИПС клетки, их выращивали в течение недели на среде с бластисидином, в концентрации 2 мкг/мл. После появления клеточных клонов, выживающих в присутствии антибиотика, бластисидин убирали из среды и давали клонам дорасти до размера, позволявшего произвести их отбор. Выросшие, позитивные по зелёному флуоресцентному GFP сигналу клеточные клоны отбирали вручную с помощью микропипетки, переносили в 96-луночный планшет и выращивали до необходимого количества. Также нами был произведён перенос альфоидной^{TetO}-CMV-FVIII-ИХЧ в мышинные FVIII^{-/-}-ИПС клетки с помощью методов ММСТ (Liskovykh et al., 2016) и ретроММСТ и было получено несколько клеточных клонов. Несмотря на то, что дальнейший анализ данных клонов показал автономность альфоидной^{TetO}-CMV-FVIII-ИХЧ в данных клетках, Вестерн-блот анализ не выявил в них экспрессии гена FVIII, несмотря на наличие экспрессии гена GFP, находящегося в этой же ИХЧ. Таким образом, дальнейшая работа была сосредоточена на мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клетках с альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ.

3.5. Характеристика мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ.

Всего было отобрано 8 клонов мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ, позитивных по флуоресцентному зелёному GFP сигналу. После дальнейшего изучения выяснилось, что клетки только 2 клонов, в которые ИХЧ была перенесена с помощью метода ретроММСТ, способны экспрессировать ген фактора свёртывания крови VIII (клоны №1 и 2). С помощью иммуноцитохимического окрашивания было показано, что данные клеточные клоны содержат маркеры плюрипотентности Nanog и Oct4 (Рис. 5, а). Также, полученные клетки были подкожно инъецированы бестимусным мышам линии NUDE и сформировали тератомы, содержавшие ткани всех трёх зародышевых листков (эктодерма, мезодерма и энтодерма) (Рис. 5, б). Были получены препараты метафазных пластинок данных клеток и с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было показано, что альфоидная^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ присутствует в этих клетках в автономной форме (Рис. 5, в).

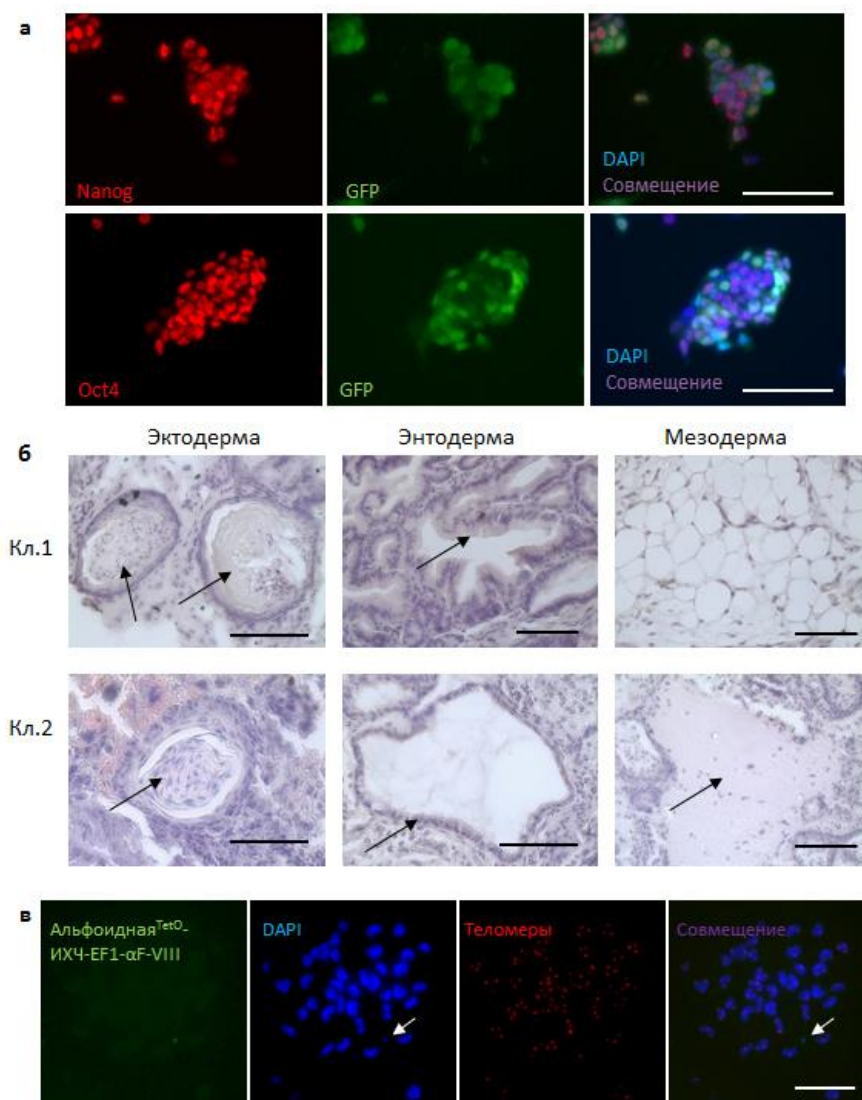


Рисунок 5. Характеристика мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ. а) Иммуноцитохимическое окрашивание мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ (клон №2) антителами против белка Nanog (верхняя панель) и антителами против белка Oct4 (нижняя панель). Масштабная линейка – 100 мкм. б) Окраска гематоксилином – эозином парафиновых срезов тератом, выращенных из FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ клеток (клоны №1 и 2) в бестимусных мышах линии NUDE. Стрелками обозначены: кератиновый эпидермис (эктодерма, клоны 1 и 2), кишечный эпителий (энтодерма, клон 1), железистый бокаловидный эпителий (энтодерма, клон 2), адипоциты (мезодерма, клон 1) и хрящевая ткань (мезодерма, клон 2). Масштабная линейка – 100 мкм. в) FISH анализ препарата метафазных пластинок из FVIII^{-/-}-ИПС клетках, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ (клон №2). Зелёный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфоидной^{TetO}-ИХЧ, красный сигнал – зонд к теломерным последовательностям. Масштабная линейка – 10 мкм.

Чтобы определить стабильность экспрессии гена FVIII в обоих клонах мышинных FVIII^{-/-}-ИПС клеток, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ, клетки выращивали до 5 и 10 пассажа, затем анализировали клеточные лизаты методом Вестерн-блот. Поскольку клетки выращивали на среде без бластисидина, в культуре происходило постепенное накопление клеток, теряющих ИХЧ, поэтому перед приготовлением лизата, отбирали только клетки, позитивные по флуоресцентному зелёному GFP сигналу с помощью проточного флуоресцентного сортера. С помощью Вестерн-блот анализа было показано, что уровень экспрессии гена FVIII в обоих из полученных клеточных клонов не отличается на 5 и 10 пассажах, и, таким образом, экспрессию можно характеризовать как стабильную (Рис. 6). Также стоит отметить, что экспрессия гена FVIII в клетках CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клон

№2) оказалась в несколько раз выше, чем в FVIII^{-/-}-ИПС клетках мыши (обе содержали одну копию альфоидной^{TetO}-EF1-α-FVIII-ИХЧ (Рис. 6).

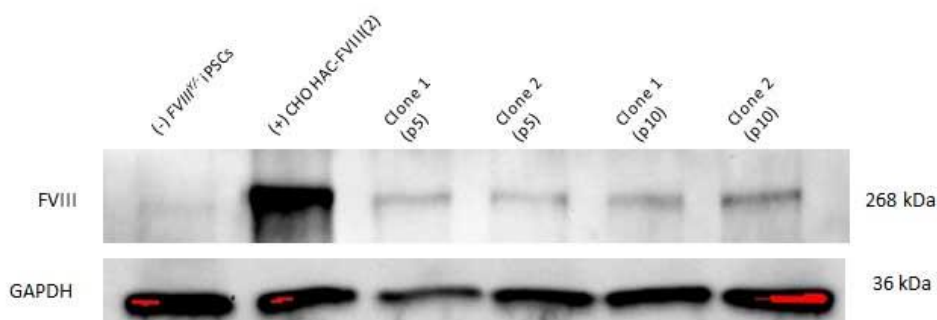


Рисунок 6. Вестерн-блот анализ экспрессии гена FVIII в FVIII^{-/-}-ИПС клетках мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1-α-FVIII-ИХЧ (клоны №1 и 2) на 5 (p5) и 6 (p6) пассажах. В качестве негативного контроля использовался лизат, полученный из исходных мышинных FVIII^{-/-} ИПС клеток. Позитивный контроль - клетки CHO-ИХЧ-EF1-α-FVIII (клон №2). Для контроля нагрузки общего белка, мембрану окрашивали также с помощью антител против белка глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

3.6. Перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ЭС клетки мыши и получение химерных мышей.

Также в клетках линии CHO нами было произведено встраивание вектора pCAG-GFP (Рис. 1) в альфоидную^{TetO}-ИХЧ. С помощью метода ММСТ конструкция pCAG-GFP-ИХЧ была перенесена в мышинные ЭС клетки линии E14. На среде с бластисидином было отобрано 5 клеточных клонов, в 2 из них были подтверждены автономность ИХЧ, нормальный кариотип (Рис. 7, а) и высокий процент GFP-позитивных клеток. С помощью иммуноцитохимического анализа было показано, что в обоих клонах ЭС-ИХЧ-GFP клеток происходит экспрессия маркеров плюрипотентности Nanog, Oct4 и SSEA (Рис. 7, б). После подкожного введения данных клеток мышам линии NUDE, развивались тератомы, в которых были обнаружены ткани всех трёх зародышевых листков (Рис. 7, в).

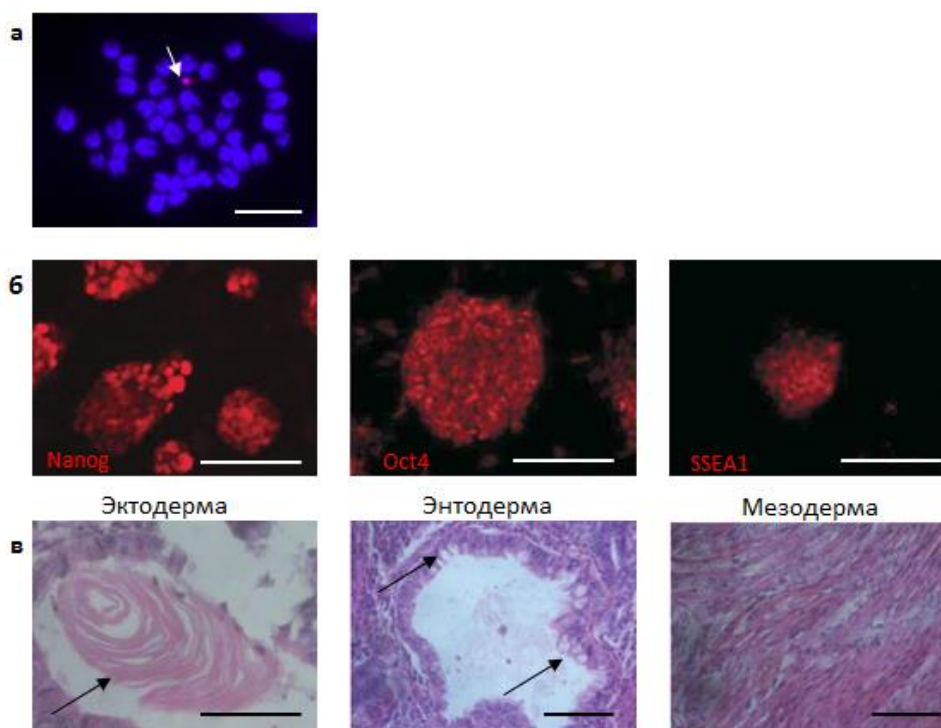


Рисунок 7. Характеристика ЭС клеток мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ. **а)** FISH анализ препарата метафазных пластинок, приготовленного из ЭС клеток мыши с альфодной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ. Красный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Масштабная линейка – 5 мкм. **б)** Иммуноцитохимическое окрашивание ЭС клеток мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ антителами против белка *Nanog*, *Ost4* и *SSEA1*. Масштабная линейка – 100 мкм. **в)** Окраска гематоксилином – эозином парафиновых срезов тератом, выращенных из ЭС клеток мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ в бестимусных мышах линии NUDE. Стрелками обозначены: кератиновый эпидермис (эктодерма) и железистый бокаловидный эпителий (энтодерма), мезодерма представлена мышечной тканью. Масштабная линейка – 100 мкм.

Также, данные клетки были инъецированы в мышинные бластоцисты (Рис. 8, а), которые затем имплантировали трём самкам. У двух самок из имплантированных бластоцист развивались полноценные химерные мыши (Рис. 8, б). С помощью гистологического анализа было показано, что у химерных мышей в тканях всех трёх зародышевых листков содержатся GFP-позитивные клетки (Рис. 8, г). Из кончика хвоста одной из химерных мышей были выделены фибробласты, которые вывели в культуру и использовали для приготовления препарата метафазных пластинок. Препарат анализировали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, и было показано, что в клетках, содержащих CAG-GFP-ИХЧ, искусственная хромосома присутствует в автономном, неинтегрированном в хромосомы мышинных клеток, состоянии (Рис. 8, в).

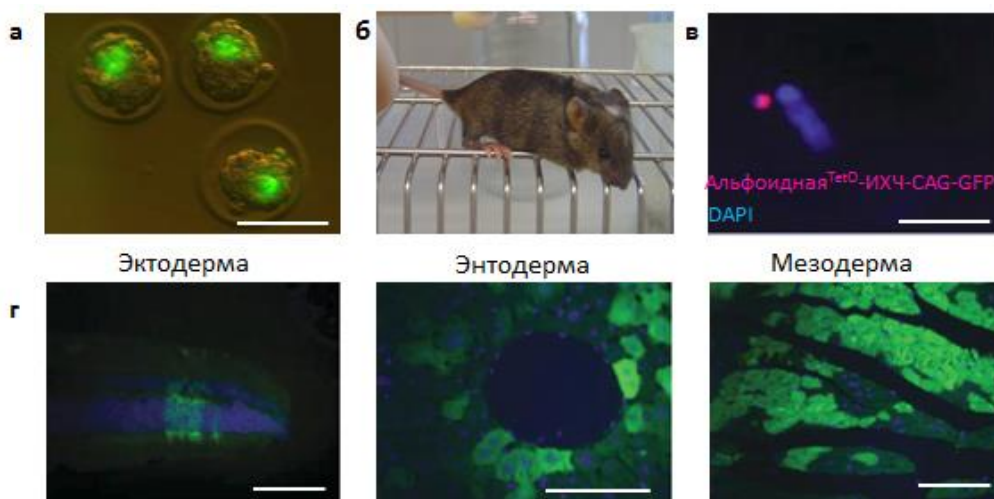


Рисунок 8. Химерные мыши, содержащие ЭС клетки с альфоидной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ. **а)** Бластоцисты мыши после инъекции в них ЭС клеток с альфодной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ (зелёные). Масштабная линейка – 100 мкм. **б)** Химерная мышь. **в)** FISH анализ препарата метафазных пластинок из фибробластов химерной мыши с альфодной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ. Красный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Масштабная линейка – 5 мкм. **г)** Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов сетчатки (эктодермальное происхождение), печени (энтодермальное происхождение) и сердечной мышцы (мезодермальное происхождение) химерных мышей. Зелёный сигнал – белок GFP в клетках, содержащих ИХЧ. Масштабная линейка – 100 мкм.

3.7. Оценка устойчивости альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС и ЭС клетках мыши.

Также мы оценили показатель потери альфоидной^{TetO}-ИХЧ за день в клетках ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клоны 1 и 2), ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII, а также мышинных эмбриональных стволовых клетках, содержащих альфоидную^{TetO}-ИХЧ с геном GFP под контролем промотора CAG в качестве трансгена (ЭС-ИХЧ-GFP). Для оценки данного показателя использовался стандартный подход (Pesenti et al., 2018). Клетки выращивали в течение 20 суток на среде с добавлением бластисидина (4 мкг/мл), после этого, когда большая часть клеток, не содержащих альфоидную^{TetO}-ИХЧ оказывается элиминирована из культуры, отбирали часть клеточного материала для его анализа с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и проточной цитофлуориметрии (FACS), остальные клетки

продолжали выращивать на среде без бластисидина. Через 15 дней ещё раз отбирали клетки для их анализа теми же методами (Рис. 9). С помощью проточной цитофлуориметрии определяли процент позитивных по зелёному флуоресцентному GFP сигналу клеток в культуре (соответственно тех клеток, в которых содержится альфоидная^{TetO}-ИХЧ с активным GFP-трансгеном) (Табл. 1). С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* зондов, специфичных к альфоидной^{TetO}-ДНК и препаратов метафазных пластинок, определяли процент клеток, содержащих в геноме альфоидную^{TetO}-ИХЧ (Табл. 2). Полученные показатели позволили рассчитать показатель суточной потери клетками альфоидной^{TetO}-ИХЧ (Табл. 1 и 2).

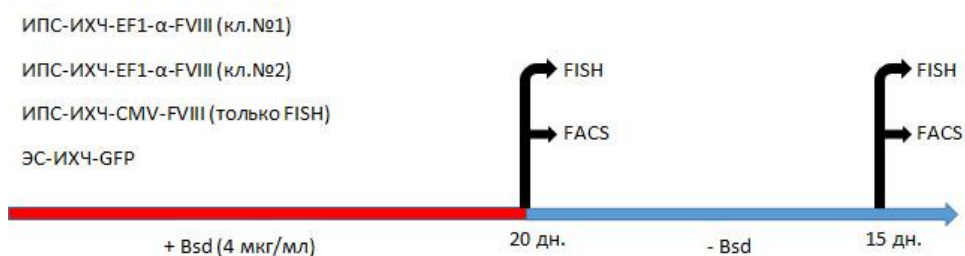


Рисунок 9. Схема эксперимента по подсчёту показателя потери альфоидной^{TetO}-ИХЧ в день. Клетки выращивали в течение 15 дней в присутствии бластисидина (4 мкг/мл), после чего часть клеток использовали для анализа с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и проточной цитофлуориметрии (FACS), остальные клетки продолжали инкубировать ещё 15 дней без бластисидина и ещё раз отбирали образцы для аналогичного анализа. Для эксперимента использовали клетки, перечисленные на рисунке.

Таблица 1. Показатели стабильности альфоидной^{TetO}-ИХЧ в клетках, определённых с помощью проточной цитофлуориметрии (FACS).

FACS	ЭС-ИХЧ-GFP	ИПС-ИХЧ-EF1-α-F8 (Кл. №1)	ИПС-ИХЧ-EF1-α-F8 (Кл. №2)
На 20 день с Bsd	97.24%	92.66%	92.52%
На 15 день без Bsd	91.50%	48.61%	45.78%
Потеря ИХЧ в день*	0.004	0.042	0.045

*(доля клеток в культуре, теряющих ИХЧ за сутки)

Таблица 2. Показатели стабильности альфоидной^{TetO}-ИХЧ в клетках, определённых с помощью FISH-анализа препаратов метафазных пластинок.

FISH	ЭС-ИХЧ-GFP	ИПС-ИХЧ-EF1-α-F8 (Кл. №1)	ИПС-ИХЧ-EF1-α-F8 (Кл. №2)	ИПС-ИХЧ-CMV-F8
На 20 день с Bsd	96.67%	96.67%	96.67%	80.00%
На 15 день без Bsd	85.71%	36.73%	59.37%	73.33%
Потеря ИХЧ в день*	0.008	0.062	0.032	0.006

*(доля клеток в культуре, теряющих ИХЧ за сутки)

3.8. Перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПС клетки человека.

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) были репрограммированы в ИПС клетки (Рис. 10, а). С помощью метода ретро-ММСТ в них был осуществлён перенос альфоидной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ из клеток линии CHO. С помощью иммуноцитохимического

окрашивания было показано, что ИПС клетки, содержащие ИХЧ, экспрессируют гены факторов плюрипотентности Oct4, Sox2 и Nanog (Рис. 10, б). Проведённый FISH анализ препаратов метафазных пластинок, выделенных из данных клеток, показал, что ИХЧ находится в них в автономном состоянии (Рис. 10, в)(S. Sinenko et al., 2018).

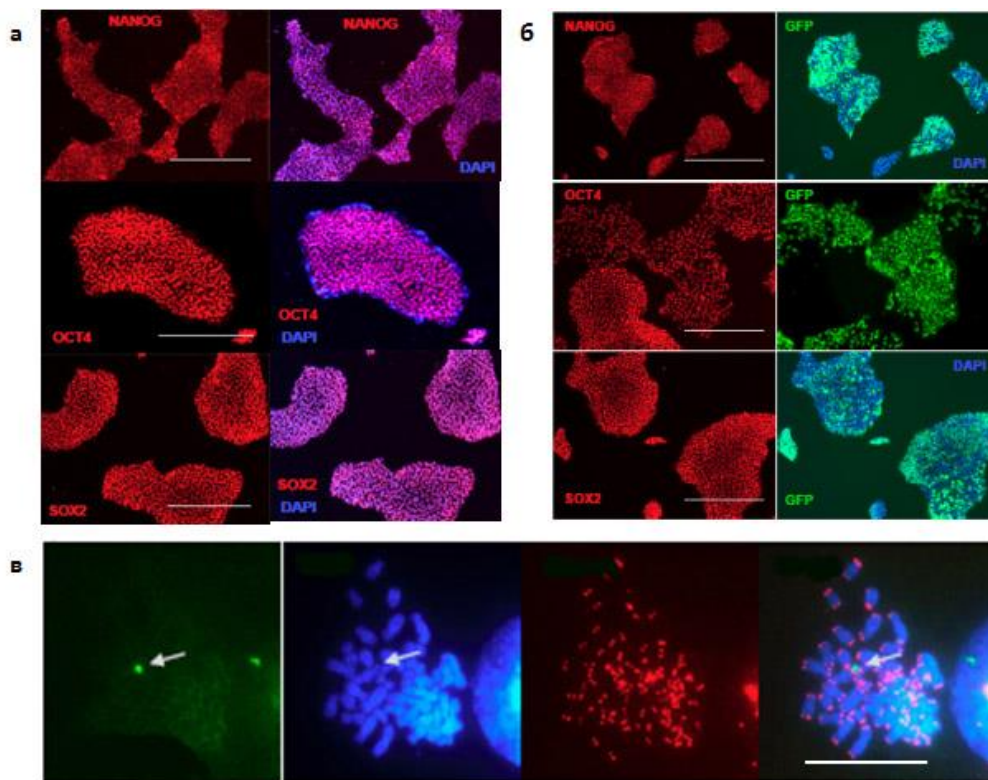


Рисунок 10. Характеристика полученных ИПС клеток человека. а) Иммуноцитохимическое окрашивание ИПС клеток человека (полученных в результате репрограммирования МСК человека) на факторы плюрипотентности Nanog, Oct4 и Sox2 (красный сигнал). Зелёный сигнал – трансгенный белок GFP. Масштабная линейка – 400 мкм. **б)** Иммуноцитохимическое окрашивание ИПС клеток человека, содержащих альфоидную^{TetO}-ИХЧ с трансгеном CAG-GFP, на факторы плюрипотентности Nanog, Oct4 и Sox2 (красный сигнал). Зелёный сигнал – трансгенный белок GFP. Масштабная линейка – 400 мкм. **в)** FISH анализ препарата метафазных пластинок. Зелёный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Красный сигнал – теломеры. Масштабная линейка – 10 мкм.

4. ОБСУЖДЕНИЕ.

4.1. Влияние альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ на плюрипотентные свойства мышинных ИПС и ЭС клеток.

В ходе данной работы из фибробластов нокаутных FVIII^{-/-} мышей были получены ИПС клетки. (Рис. 4). После переноса в данные FVIII^{-/-} ИПС клетки терапевтической альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ, был подтверждён их плюрипотентный статус (Рис. 5, а, б). Таким образом, разрабатываемый нами подход, по всей видимости может позволить в дальнейшем дифференцировать FVIII^{-/-} ИПС клетки с терапевтической альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ, содержащей гены GFP и FVIII в качестве трансгенов, в клетки тканей, вырабатывающих белок FVIII в организме.

Также нами был осуществлён перенос альфоидной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ в ЭС клетки мыши и ИПС клетки человека. Перенос в эти клетки искусственной хромосомы обеспечил экспрессию в них трансгена GFP и не повлиял на экспрессию генов факторов плюрипотентности (Рис. 7, б и 10, б). ЭС клетки мыши с альфоидной^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ после подкожного введения бестимусным мышам линии NUDE формировали тератомы, в

которых были представлены ткани всех трёх зародышевых листков (Рис. 7, в). Трансплантации этих клеток в бластоцисты мыши не нарушали процесс развития эмбрионов, и производные данных клеток, экспрессирующие трансген (GFP) были обнаружены во всех проанализированных тканях половозрелых химерных мышей (Рис. 8, г).

Ранее было показано, что многие ИХЧ других типов также не влияют на плюрипотентный статус стволовых клеток (Katona, 2015; Moralli & Monaco, 2015; N. Suzuki et al., 2006), однако перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ЭС клетки мыши и ИПС клетки мыши и человека впервые был произведён в нашей лаборатории. Полученные данные позволяют утверждать, что альфоидная^{TetO}-ИХЧ является адекватным инструментом для обеспечения экспрессии трансгенов в плюрипотентных стволовых клетках.

4.2. Особенности экспрессии трансгенов в полученных клетках.

Для встраивания в альфоидную^{TetO}-ИХЧ гена FVIII, нами были получены 2 плазмидные конструкции (Рис. 1). После того как была произведена Cre/lox рекомбинация данных векторных конструкций и альфоидной^{TetO}-ИХЧ (Рис. 2), находящейся в клетках СНО 38.18, были отобраны клеточные клоны СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII и СНО-ИХЧ-CMV-FVIII. С помощью Вестерн-блот анализа было показано, что экспрессия гена FVIII происходит как в клетках СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII, так и в клетках СНО-ИХЧ-CMV-FVIII (Рис. 3, б). Помимо гена FVIII в клетках СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII и СНО-ИХЧ-CMV-FVIII происходит также экспрессия гена GFP, и флуоресцентный зелёный сигнал его белкового продукта регистрировался визуально под микроскопом (Рис. 3, в).

Был произведён перенос терапевтических альфоидных^{TetO}-ИХЧ из клеток СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII и СНО-ИХЧ-CMV-FVIII в FVIII^{-/-}-ИПС клетки мыши. В полученных клетках ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII, с помощью флуоресцентного микроскопа выявляется на высоком уровне зелёный сигнал белкового продукта GFP трансгена, однако Вестерн-блот анализ позволил выявить экспрессию трансгена FVIII только в клеточных клонах ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII, причём её уровень был сильно ниже, чем в клетках СНО, содержащих такую же генетическую конструкцию (Рис. 6).

Таким образом, мы наблюдаем разницу в уровне экспрессии трансгена FVIII в разных клетках (СНО и мышинных ИПС), а также в одинаковых клетках, но содержащих разные трансгены (клетки ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII). Также нами отмечено, что экспрессия гена GFP имеет место как в ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII, так и в ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII, причём на достаточно высоком уровне. В ЭС клетках мыши и ИПС клетках человека, содержащих альфоидную^{TetO}-CAG-GFP-ИХЧ, также был обнаружен высокий уровень экспрессии трансгена GFP.

По всей видимости, одним из объяснений такого различия может быть разный эпигенетический статус альфоидной^{TetO}-ИХЧ, который она может приобретать в различных клеточных линиях. Ранее было отмечено, что экспрессия трансгена, находящегося в альфоидной^{TetO}-ИХЧ может «замолкнуть» в клетках благодаря эпигенетическому сайленсингу (Kononenko et al., 2013; S. Sinenko et al., 2018). Исходя из этого, можно предположить, что в клеточной популяции могут присутствовать клетки, содержащие альфоидную^{TetO}-ИХЧ, но не экспрессирующие при этом трансген.

Другими группами также отмечалось, что уровень экспрессии трансгена, находящегося в составе ИХЧ может отличаться в зависимости от типа клеток, в которых находится векторная конструкция (N. Suzuki et al., 2009).

Поскольку в клетках ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII мы наблюдали высокий уровень экспрессии трансгена GFP и низкий уровень экспрессии трансгена FVIII (в клетках ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII экспрессии данного трансгена вовсе не было зафиксировано), мы полагаем, что в данных клетках происходит конкуренция между промоторами CMV или EF1- α , контролирующими ген FVIII и промотором CAG, контролирующим ген GFP. Таким образом, можно предположить, что в нашей векторной системе промотор CMV является более слабым по отношению к промотору CAG и транскрипционная активность переходит полностью к гену GFP, тогда как промотор EF1- α и расположенный между ним и промотором CAG инсультатор cHS4, позволяют обеспечить экспрессию гена FVIII, правда и более слабую чем гена GFP.

Несмотря на то, что уровень экспрессии трансгена FVIII в клетках ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII является не очень высоким и уступает уровню экспрессии трансгена GFP, всё же он оказывается стабильным в клетках, содержащих альфоидную^{TetO}-ИХЧ (Рис. 6).

Ранее японской группой Ошимуры был произведён перенос ИХЧ, собранной на основе усечённой 21 хромосомы человека (21HAC2) и содержащей 16 копий укороченной BDD-формы кДНК гена FVIII под контролем промотора CAG, в иммортализованные мезенхимные стволовые клетки человека. Использование такого большого количества повторов трансгена позволило обеспечить его стабильную экспрессию клетками-реципиентами на достаточно высоком уровне (Kurosaki et al., 2011). Этой же группой был осуществлён перенос ИХЧ (21HAC2) с 4 копиями укороченной BDD-формы кДНК гена FVIII под контролем человеческого промотора тромбоцитарного фактора 4 (промотор PF4), активность которого наблюдается в мегакариоцитах, в мышинные ИПС клетки, полученные из эмбриональных фибробластов мутантных FVIII^{-/-}-мышей. После дифференцирования таких ИПС клеток, содержащих ИХЧ в мегакариоциты, в них была обнаружена экспрессия трансгена FVIII (Yakura et al., 2013). Таким образом данная научная группа добилась увеличения уровня экспрессии гена FVIII клетками, несущими терапевтическую ИХЧ, путём увеличения количества копий трансгена.

4.3. Стабильность альфоидной^{TetO}-ИХЧ в плюрипотентных стволовых клетках мыши.

Поскольку до нас никто не производил перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в плюрипотентные стволовые клетки мыши (как ИПС, так и ЭС клетки), в литературе отсутствуют данные о её стабильности в этих клетках, важных для лабораторной практики. Мы произвели подсчёт показателя суточной потери ИХЧ, с помощью проточной цитофлуориметрии (Табл. 1) и с помощью FISH анализа (Табл. 2). Высокий уровень стабильности альфоидной^{TetO}-ИХЧ был обнаружен в клетках ЭС-ИХЧ-GFP: показатели суточной утраты (доля клеток в культуре, теряющих ИХЧ за сутки) – 0,004 и 0,008 (посчитанные с помощью проточной цитофлуориметрии и FISH анализа, соответственно) и в клетках ИПС-ИХЧ-CMV-FVIII – 0,006 (определён с помощью FISH анализа). Такие показатели утраты альфоидной^{TetO}-ИХЧ, указывают на высокий уровень стабильности данной конструкции в этих клетках (Pesenti et al., 2018).

Суточная утрата альфоидной^{TetO}-ИХЧ клетками ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клоны 1 и 2) оказалась на порядок выше и составила 0,04 - 0,045 и 0,03 – 0,06 при подсчёте с помощью проточной цитофлуориметрии и FISH анализа соответственно.

При переносе ИХЧ из клеток линии CHO в другие клеточные типы, обычно получают большой набор содержащих ИХЧ клеточных клонов, которые при этом могут довольно сильно отличаться по стабильности поддержания в них ИХЧ. Обычно производят отбор

самого стабильного клона, который затем дополнительно субклонировать, ещё раз отбирая наиболее стабильный субклон. Такой подход позволяет отобрать клетки, стабильность ИХЧ в которых может довольно сильно превышать стабильность ИХЧ в изначальном клеточном клоне (Pesenti et al., 2018). По всей видимости, тем, что изначально в нашем распоряжении оказалось всего 2 клон ИПС-ИХЧ-EF1- α -FVIII клеток, можно объяснить довольно высокий уровень утраты ими альфоидной^{TetO}-ИХЧ, однако дальнейшее субклонирование наших клеточных линий может позволить отобрать более стабильные клеточные клоны.

ВЫВОДЫ.

- 1) Впервые осуществлён перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в плюрипотентные стволовые клетки человека и мыши.
- 2) С помощью альфоидной^{TetO}-ИХЧ, содержащей ген фактора свёртывания крови VIII человека под контролем повсеместного промотора EF1- α , возможно обеспечить экспрессию данного гена в ИПС клетках мыши.
- 3) Наличие в ИПС клетках мыши и человека альфоидной^{TetO}-ИХЧ с трансгеном не нарушает их плюрипотентных свойств.
- 4) Наличие в ЭС клетках мыши альфоидной^{TetO}-ИХЧ с трансгеном GFP не нарушает их плюрипотентных свойств, а также не влияет на развитие химерных эмбрионов, содержащих такие клетки.
- 5) Показатель суточной утраты альфоидной^{TetO}-ИХЧ оказался высоким для ЭС клеток мыши (0,004 – 0,008) и находится в диапазоне от 0,006 до 0,065 для ИПС клеток, в зависимости от клеточного клона.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ.

Статьи:

- 1) Liskovykh, M., Ponomartsev, S., Popova, E., Bader, M., Kouprina, N., Larionov, V., Alenina, N., & Tomilin, A. (2015). Stable maintenance of de novo assembled human artificial chromosomes in embryonic stem cells and their differentiated progeny in mice. *Cell Cycle*, 14(8), 1268–1273. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1014151>
- 2) Ponomartsev, S. V., Sinenko, S. A., Skvortsova, E. V., Liskovykh, M. A., Voropaev, I. N., Savina, M. M., Kuzmin, A. A., Kuzmina, E. Y., Kondrashkina, A. M., Larionov, V., Kouprina, N., & Tomilin, A. N. (2020). Human AlphoidtetO Artificial Chromosome as a Gene Therapy Vector for the Developing Hemophilia A Model in Mice. *Cells*, 9(4), 879. <https://doi.org/10.3390/cells9040879>
- 3) Sinenko, S. A., Ponomartsev, S. V., & Tomilin, A. N. (2020). Human artificial chromosomes for pluripotent stem cell-based tissue replacement therapy. *Experimental Cell Research*, 389(1), 111882. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111882>
- 4) Sinenko S.A., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N. (2020) Pluripotent Stem Cell-Based Gene Therapy Approach: Human *de novo* Synthesized Chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*

Тезисы:

- 1) Лисковых М.А., Куприна Н, Ларионов В, Пономарцев С.В., Попова Е., Бадер М., Аленина Н., Томилин А.Н.: Искусственные хромосомы человека: новый подход к трансгенезу. *Цитология* 2014; 56 (5): 372.
- 2) Пономарцев С.В., Лисковых М.А., Томилин А.Н.: Применение искусственной хромосомы человека для лечения тяжёлого комбинированного иммунодефицита на примере мутантных мышей. *Цитология* 2014; 56(5): 376.
- 3) Пономарцев С.В., Лисковых М.А., Ларионов В, Куприна Н, Кондрашкина А.М., Попова Е., Бадер М., Аленина Н., Томилин А.Н.: Искусственная хромосома человека, как вектор для генотерапевтических целей. *Цитология* 2014; 56(9): 675.
- 4) Ponomartsev S, Kuzmin A, Kondrashkina A, Kuzmina E, Bader M, Alenina N, Liskovykh M, Kouprina N, Larionov V, Sinenko S, Tomilin A: Murine tissue replacement gene therapeutic model: development of mutant induced pluripotent cells and the recombinant artificial chromosome vectors (p.44). Abstracts for Cell Technologies at the Edge: Research & Practice (CTERP) (Saint-Petersburg, april 6-8).

5) С.В. Пономарцев, И.Н. Воропаев, С.А. Синенко, Н. Куприна, В.Л. Ларионов, А.Н. Томилин: Доставка альфоидной искусственной хромосомы человека с геном фактора свёртывания крови 8 (FVIII) в ИПС клетки мыши гемофильного фенотипа. *Гены и клетки*, 2019; 14(3): 113.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 157–162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811426106>
- Chan, D. Y., Moralli, D., Wheatley, L., Jankowska, J. D., & Monaco, Z. L. (2020). Multigene human artificial chromosome vector delivery with herpes simplex virus 1 amplicons. *Experimental Cell Research*, 388(2), 111840. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111840>
- Ebersole, T., Kim, J. H., Samoshkin, A., Kouprina, N., Pavlicek, A., White, R. J., & Larionov, V. (2011). tRNA genes protect a reporter gene from epigenetic silencing in mouse cells. *Cell Cycle*, 10(16), 2779–2791. <https://doi.org/10.4161/cc.10.16.17092>
- Iida, Y., Kim, J. H., Kazuki, Y., Hoshiya, H., Takiguchi, M., Hayashi, M., Erliandri, I., Lee, H. S., Samoshkin, A., Masumoto, H., Earnshaw, W. C., Kouprina, N., Larionov, V., & Oshimura, M. (2010). Human artificial chromosome with a conditional centromere for gene delivery and gene expression. *DNA Research*, 17(5), 293–301. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsq020>
- Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N. I., Cooke, H., & Masumoto, H. (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nature Biotechnology*, 16(5), 431–439. <https://doi.org/10.1038/nbt0598-431>
- Ikeno, M., & Hasegawa, Y. (2020). Applications of bottom-up human artificial chromosomes in cell research and cell engineering. *Experimental Cell Research*, 390(1), 111793. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111793>
- Katona, R. L. (2015). De novo formed satellite DNA-based mammalian artificial chromosomes and their possible applications. *Chromosome Research*, 23(1), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9458-0>
- Kononenko, A. V., Lee, N. C. O., Earnshaw, W. C., Kouprina, N., & Larionov, V. (2013). Re-engineering an alphoid tetO-HAC-based vector to enable high-throughput analyses of gene function. *Nucleic Acids Research*, 41(10), 1–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt205>
- Kononenko, A. V., Lee, N. C. O., Liskovych, M., Masumoto, H., Earnshaw, W. C., Larionov, V., & Kouprina, N. (2015). Generation of a conditionally self-eliminating HAC gene delivery vector through incorporation of a tTA^{VP64} expression cassette. *Nucleic Acids Research*, 43(9), 1–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv124>
- Kouprina, N., & Larionov, V. (2015). Recent advances in chromosome engineering. *Chromosome Research*, 23(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9469-5>
- Kurosaki, H., Hiratsuka, M., Imaoka, N., Iida, Y., Uno, N., Kazuki, Y., Ishihara, C., Yakura, Y., Mimuro, J., Sakata, Y., Takeya, H., & Oshimura, M. (2011). Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. *Journal of Human Genetics*, 56(10), 727–733. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.88>
- Lee, N. C., Kononenko, A. V., Lee, H. S., Tolkunova, E. N., Liskovych, M. A., Masumoto, H., Earnshaw, W. C., Tomilin, A. N., Larionov, V., & Kouprina, N. (2013). Protecting a transgene expression from the HAC-based vector by different chromatin insulators. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3723–3737. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1362-9>
- Liskovych, M., Lee, N. C., Larionov, V., & Kouprina, N. (2016). Moving toward a higher efficiency of microcell-mediated chromosome transfer. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 3(December 2015), 16043. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.43>
- Moralli, D., & Monaco, Z. L. (2015). Developing de novo human artificial chromosomes in embryonic stem cells using HSV-1 amplicon technology. *Chromosome Research*, 23(1), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9456-2>
- Moralli, D., & Monaco, Z. L. (2020). Gene expressing human artificial chromosome vectors: Advantages and challenges for gene therapy. *Experimental Cell Research*, 390(1), 111931. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111931>
- Oshimura, M., Kazuki, Y., Iida, Y., & Uno, N. (2013). New Vectors for Gene Delivery: Human and Mouse Artificial Chromosomes. *ELS*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024474>
- Pesenti, E., Kouprina, N., Liskovych, M., Aurich-Costa, J., Larionov, V., Masumoto, H., Earnshaw, W. C., & Molina, O. (2018). Generation of a Synthetic Human Chromosome with Two Centromeric Domains for Advanced Epigenetic Engineering Studies [Research-article]. *ACS Synthetic Biology*, 7(4), 1116–1130. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00018>
- Popova, E., Rentzsch, A. B., & Bader, A. M. (2008). *Generation and characterization of a GFP transgenic rat line for embryological research*. 955–963. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9189-0>
- Raab, J. R., Chiu, J., Zhu, J., Katzman, S., Kurukuti, S., Wade, P. A., Haussler, D., & Kamakaka, R. T. (2012). Human

- tRNA genes function as chromatin insulators. *EMBO Journal*, 31(2), 330–350.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.406>
- Sinenko, S. A., Ponomartsev, S. V., & Tomilin, A. N. (2020). Human artificial chromosomes for pluripotent stem cell-based tissue replacement therapy. *Experimental Cell Research*, 389(1), 111882.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111882>
- Sinenko, S., Skvortsova, E., Liskovyykh, M., Ponomartsev, S., Kuzmin, A., Khudiakov, A., Malashicheva, A., Alenina, N., Larionov, V., Kouprina, N., & Tomilin, A. (2018). Transfer of Synthetic Human Chromosome into Human Induced Pluripotent Stem Cells for Biomedical Applications. *Cells*, 7(12), 261.
<https://doi.org/10.3390/cells7120261>
- Skvortsova, E. V., Sinenko, S. A., & Tomilin, A. N. (2018). Immortalized murine fibroblast cell lines are refractory to reprogramming to pluripotent state. *Oncotarget*, 9(81), 35241–35250.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26235>
- Suzuki, N., Itou, T., Hasegawa, Y., Okazaki, T., & Ikeno, M. (2009). Cell to cell transfer of the chromatin-packaged human β -globin gene cluster. *Nucleic Acids Research*, 38(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1168>
- Suzuki, N., Nishii, K., Okazaki, T., & Ikeno, M. (2006). Human artificial chromosomes constructed using the bottom-up strategy are stably maintained in mitosis and efficiently transmissible to progeny mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26615–26623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603053200>
- Suzuki, T., Kazuki, Y., Oshimura, M., & Hara, T. (2016). Highly efficient transfer of chromosomes to a broad range of target cells using Chinese hamster ovary cells expressing murine leukemia virus-derived envelope proteins. *PLoS ONE*, 11(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157187>
- Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., & Ishida, I. (1997). Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nature Genetics*, 16(2), 133–143. <https://doi.org/10.1038/ng0697-133>
- Yakura, Y., Ishihara, C., Kurosaki, H., Kazuki, Y., Komatsu, N., Okada, Y., Doi, T., Takeya, H., & Oshimura, M. (2013). An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(2), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.096>