ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 6, с. 405–414

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК RCPCMi009-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]

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435 Россия*

[b]*Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, пер. Кооперативный, 5, Томск, 634050 Россия*

[c]*Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997 Россия*

[d]*Центр 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*

[e]*Сколковский 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 Х-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* (RCPCMi009-A-1) с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Нокаут гена *UBE2A* был подтвержден Вестерн-блоттингом. Плюрипотентность линии ИПСК RCPCMi009-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: Х-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 Е2 А (*UBE2A*, ubiquitin conjugating enzyme E2 A), приводят к новому синдрому умственной отсталости, сцепленному с Х-хромосомой (Nascimiento et al., 2006). Ген *UBE2A* кодирует убиквитин-связывающий белок Е2, который участвует в убиквитинировании белков и играет роль в нескольких критических клеточных процессах, 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* RCPCMi009-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 CO_2-инкубаторе (5% CO_2, 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 пермеабилизации на льду в течение 30 мин, затем образцы 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

Эмбриоидные 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-меркаптоэтанола (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 эмбриоидные 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 эмбриоидные 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 пермеабилизовали 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 HNF3β/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 cytokeratin 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)	*GAPDH*	118	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA/ GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC
Маркеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	*OCT4*	887	CCTTCGCAAGCCCTCATTTC/ AACCACACTCGGACCACATC
	SOX2	278	AACCAGCGCATGGACAGTTA/ GACTTGACCACCGAACCCAT
	SALL4	303	TGGCGGAGAGGGCAAATAAC/ ATGCTGAAGAACTCCGCACA
Детекция микоплазмы	Ген рибосомной 16S РНК (праймеры GPO1/MGSO)	705–708	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
нРНК	*UBE2A*-нРНК		CAACATAATGGTGTGGAACG
Случайная интеграция плазмиды в геном	PX458 плазмида	1123	CTGGGCACATACCACGATCTG/ CGGACACCAGCTTGGACTTCAG
Анализ целевой мутации/секвенирование	Экзон 2 гена *UBE2A* chrX:118,708,862-118,708,945	520	CCCTCGACTTCGGAGA/ AACATTTTCCCCTACCCGCT
Потенциальные нецелевые эффекты редактирования	*SNX11*	114	TGGAAAGTCCCACTCTCCCA/ CATGATCTCCTCCCACAGCC
	KDM6B	354	CGTGGACTACTTGACGGGTT/ CTGGTACTGATAGGCTGCGG
	KCNE1	316	ACAGTTGAGCCAAACTCCAA/ CCCCTAACAAGAGCCAACAGT
	RP11-7 exon_RP11-7F17.5/RP11-7F17.3	528	CGGTACATTGCTCAGACTCCA/ TAGTACAGACACAGCGCCAG
	SMYD3	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 инкубировали 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 (Bogomazova 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 M-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/см^2) 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, βIII-тубуллин), 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
Исходный тип клеток	Фибробласты кожи
Дата забора биоматериала	2011 год
Способ репрограммирования	Неинтегрирующие векторы, вирус Sendai
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, C-MYC, SOX2
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нокаут гена *UBE2A*
Вид генетической модификации	Инсерция одного нуклеотида (аденозина), приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона
Подтверждение элиминации/ замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Х-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто (MIM#300860, https://omim.org/entry/300860)
Ген/локус	*UBE2A*
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным стволовым клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных телец и окрашивание специфических маркеров
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Микоплазма не обнаружена
Область применения	*In vitro* модель Х-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто
Способ культивирования	На подложке из Матригеля
Среда культивирования	mTeSR™1 (Stemcell Technologies), 1% пенициллин-стрептомицин
Температура, °С	37
Концентрация CO_2, %	5
Концентрация O_2, %	20
Способ пересева	Энзиматический, трипсин-ЭДТА (Gibco)
Кратность пересева	1 : 8–1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO, 10 мМ ингибитора ROCK Y27632 (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 (CK PAN, βIII-тубуллин), 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.

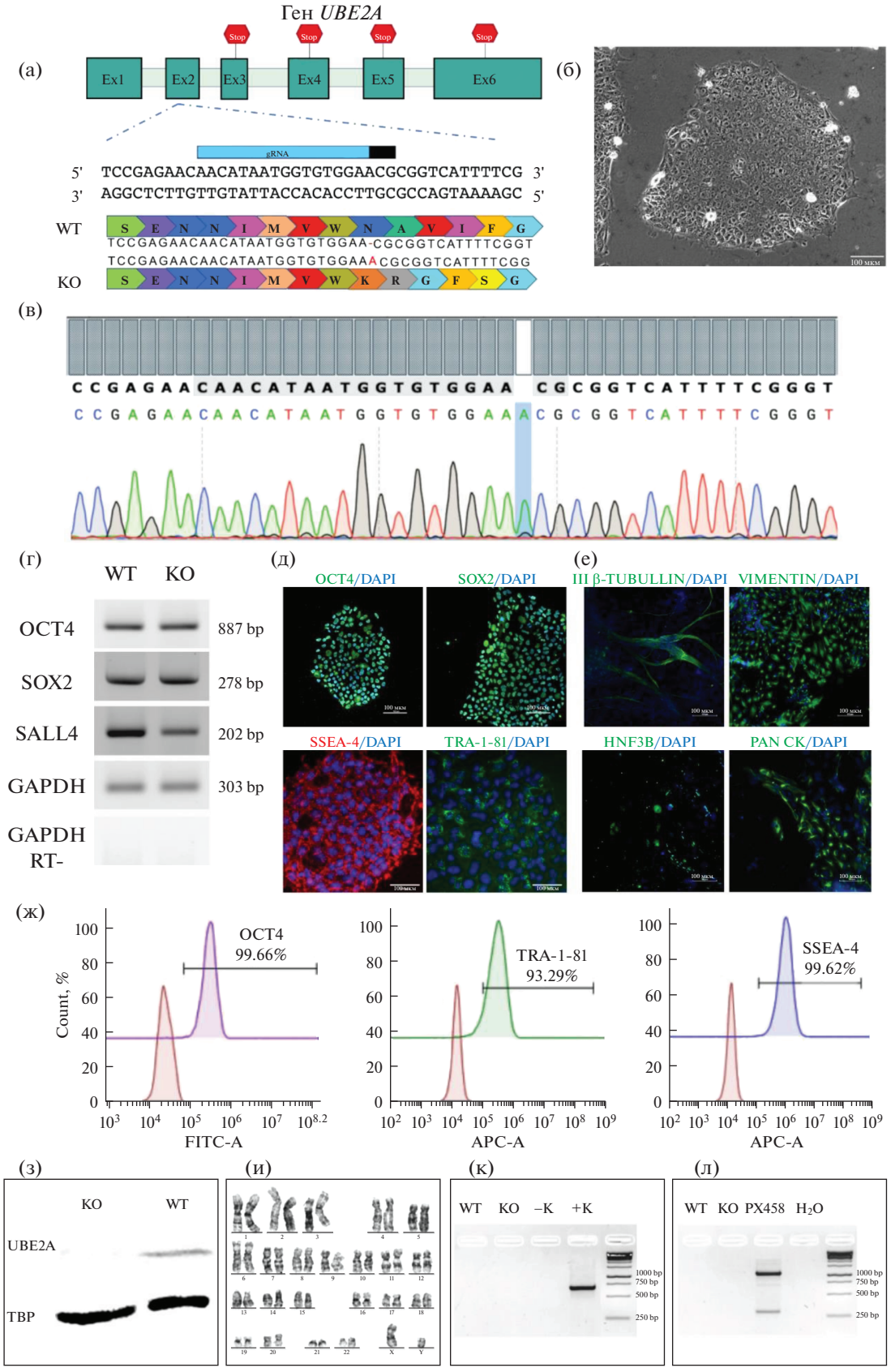
Ген UBE2A
(а)
Stop
Ex1
Ex2
Ex3
Ex4
Ex5
Ex6
gRNA
5' TCCGAGAACAACATAATGGTGTGGAACGCGGTCATTTTCG 3'
3' AGGCTCTTGTTGTATTACCACACCTTGCGCCAGTAAAAGC 5'
WT
S E N N I M V W N A V I F G
TCCGAGAACAACATAATGGTGTGGAA-CGCGGTCATTTTCGGT
TCCGAGAACAACATAATGGTGTGGAAACGCGGTCATTTTCGG
KO
S E N N I M V W K R G F S G
(б)
100 мкм
(в)
CCGAGAACAACATAATGGTGTGGAA CGCGGTCATTTTCGGGT
(г)
WT KO
OCT4 887 bp
SOX2 278 bp
SALL4 202 bp
GAPDH 303 bp
GAPDH RT-
(д)
OCT4/DAPI
SOX2/DAPI
SSEA-4/DAPI
TRA-1-81/DAPI
(е)
III β-TUBULLIN/DAPI
VIMENTIN/DAPI
HNF3B/DAPI
PAN CK/DAPI
(ж)
Count, %
OCT4 99.66%
TRA-1-81 93.29%
SSEA-4 99.62%
FITC-A
APC-A
APC-A
(з)
KO WT
UBE2A
TBP
(и)
(к)
WT KO –K +K
1000 bp
750 bp
500 bp
250 bp
(л)
WT KO PX458 H2O
1000 bp
750 bp
500 bp
250 bp

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	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1к
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбриоидных телец, 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

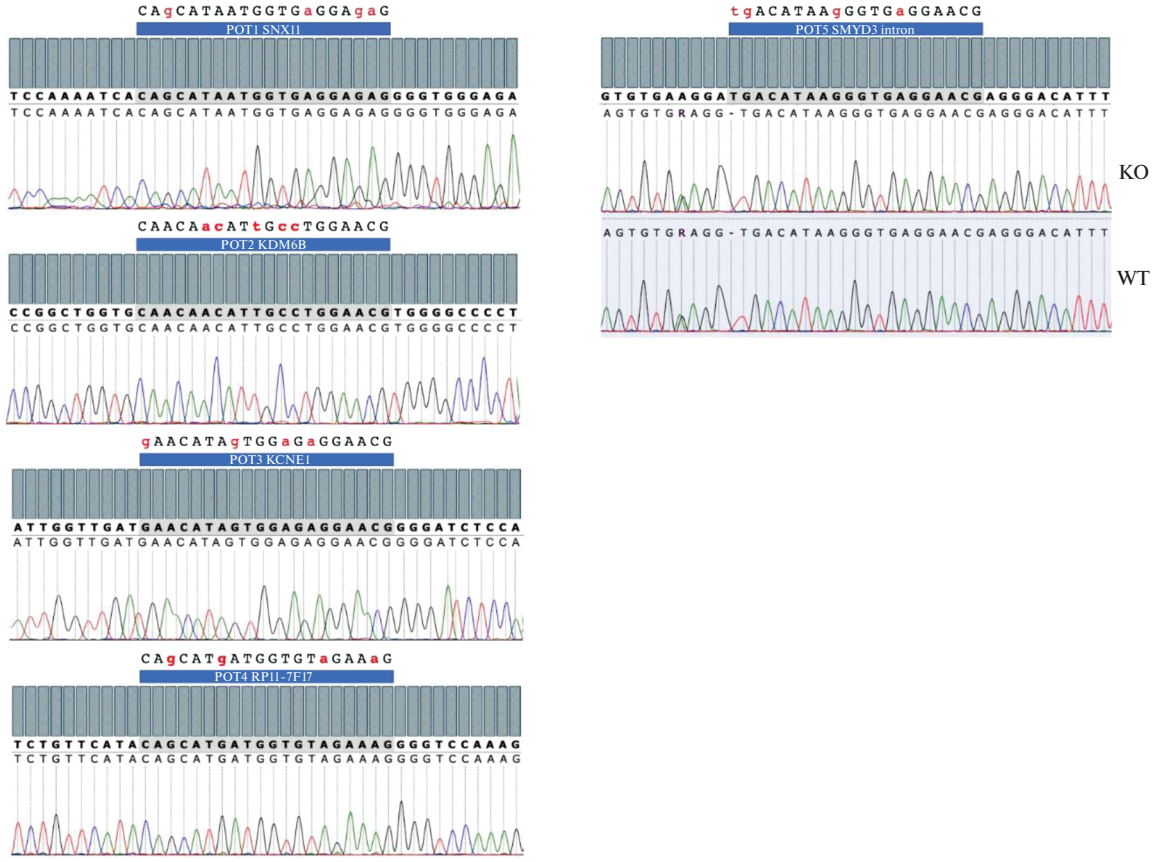

Рис. 2. Секвенирование не выявило каких-либо мутаций в основных прогнозируемых нецелевых (*англ.*, POT – potential off-target) сайтах активности нуклеазы Cas9. SNP rs2362585 и rs5782373 гена SMYD3 идентифицированы как в родительской линии, так и в отредактированном клоне. WT – дикий тип; KO – нокаут.

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 клонов 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. Surdina[1], E. A. Volovikov[1, 2], L. D. Belikova[1, 2], E. A. Zerkalenkova[3], M. A. Lagarkova[1, 4], and A. N. Bogomazova[1, 2, 4]

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

[2]Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Scieces, Tomsk, 634050 Russia

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

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

[5]Skolkovo 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