ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 6, с. 415–428

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линий плюрипотентных стволовых клеток

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

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

[a]ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук", просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

[b]ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации", ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055 Россия

[c]ФГАОУВО "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет", ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

[d]ФГБУН "Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук", просп. акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090 Россия

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

Поступила в редакцию 24.07.2023 г.
После доработки 16.10.2023 г.
Принята к публикации 18.10.2023 г.

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Детальное исследование молекулярно-генетических механизмов патогенеза наследственных заболеваний является одной из актуальных задач современной биомедицины. В последние десятилетия в арсенале исследователей появились новые подходы, которые позволяют получать более совершенные модели для исследований *in vitro*. Например, технология получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и инструменты направленного

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

Конструирование донорной плазмиды pAAVS1-AsCpf1(TYCV)

В плазмиду pAAVS1-donor был клонирован фрагмент ДНК, кодирующий программируемую нуклеазу AsCas12a (AsCpf1) (узнающую PAM 5'TYCV3', имеющую сигналы ядерной локализации nucleoplasmin NLS на С-конце и SV40 NLS на N-конце) из плазмиды pAsCpf1(TYCV)(BB) (pY211) (Addgene plasmid # 89352; http://n2t.net/addgene:89352; RRID: Addgene_89352) (Gao et al., 2017). В последовательность нуклеазы AsCpf1 (TTTV) был внесен сайт полиаденилирования SV40poly(A) и эпитоп 3XHA (рис. 1а).

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

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

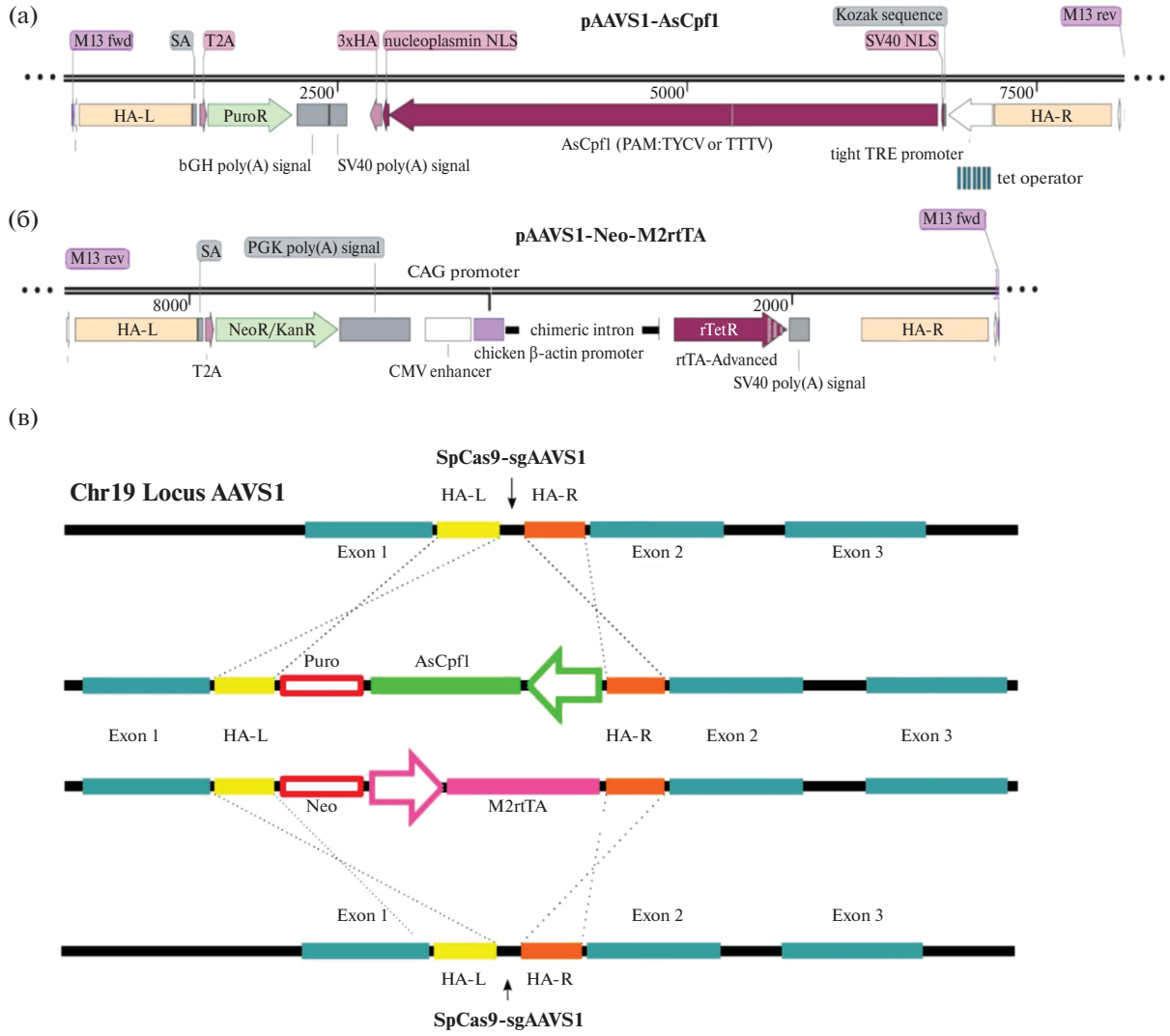

Рис. 1. (а) Схема донорных конструкций pAAVS1-AsCpf1, кодирующих нуклеазу AsCas12(Cpf1), распознающую PAM:5'TTTV3' (pAAVS1-AsCpf1(TTTV)-2NLS) и PAM:5'TYCV3' (pAAVS1-AsCpf1(TYCV)). AsCpf1 – последовательность, кодирующая нуклеазу; PuroR – ген устойчивости к пуромицину; SV40 NLS и nucleoplasmin NLS – сигналы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

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

Перед проведением эксперимента по внесению трансгенных конструкций, кодирующих гены устойчивости к пуромицину и неомицину в ИПСК ICGi022-A, были подобраны концентрации антибиотиков G418 (неомицин, “Sigma-Aldrich”, США) 50 мкг/мл и пуромицин (“Sigma-Aldrich”, США) 200 нг/мл, при которых все клетки погибали постепенно в течение 4х суток. Через 48 ч после трансфекции проводили селекцию G418 (50 мкг/мл) 72 ч в культуральной среде без пенициллина-стрептомицина. Через 24 ч после отмены G418 проводили селекцию клеток на устойчивость к пуромицину (200 нг/мл, 3–4 дня). Устойчивые к антибиотикам колонии ИПСК механическим способом переносили на лунки 48-ячеечного планшета. После достижения культурой плотности более 80% клетки пересевали в соотношении 1 : 8–10 на лунки 24-ячеечного планшета, из оставшейся части клеток выделяли ДНК и проводили ПЦР-скрининг. Для активации экспрессии

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

Выявление рекомбинантных клонов при помощи ПЦР

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

Вестерн-блот анализ

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

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмами и наличия эписом в линиях ИПСК проводили с помощью ПЦР. Программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 67°C – 15 с, 72°C – 20 с; 72°C – 5 мин (микоплазмы) и 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 62°C – 15 с, 72°C – 15 с; 72°C – 5 мин (эписомы). Праймеры указаны в табл. 1.

Анализ нецелевой активности системы CRISPR/Cas9

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

Анализ кариотипа

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

Спонтанная дифференцировка ИПСК in vitro

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

Иммунофлуоресцентное окрашивание

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

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

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

Таблица 1. Продолжение

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

Таблица 1. Окончание

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

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

Количественная ОТ-ПЦР

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

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

STR анализ

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточных линий

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

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

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

Таким образом, в эксперименте по внесению программируемой нуклеазы AsCas12a, узнающей PAM 5'TTTV3' в геном ИПСК ICGi022-A (K7-4f) были отобраны клоны K7-4f-N1.3, K7-4f-N1.26 (ICGi022-A-6) и K7-4f-N1.72, а для нуклеазы AsCas12a узнающей PAM 5' TYCV 3' – клоны K7-4f-Y1.5, K7-4f-Y1.14 и K7-4f-Y1.17 (ICGi022-A-7). На рис. 2б приведены результаты ПЦР анализа, доказывающие наличие трансгенов Puro-AsCas12a и Neo-M2rtTA и в целевом локусе *AAVS1* в клонах K7-4f-N1.26 (ICGi022-A-6) и K7-4f-Y1.17 (ICGi022-A-7).

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

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

Уникальный идентификатор	ICGi022-A-6 ICGi022-A-7
Альтернативное название линии	K7-AsCas12aN1-26 K7-AsCas12aY1-17
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 42 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Генетическая модификация	Да
Вид генетической модификации	ICGi022-A-6: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TTTV) ICGi022-A-7: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TYCV)
Заболевание	
Ген/локус	Chr19q13.42 AAVS1 локус, *PPP1R12C*
Метод внесения модификации/используемая сайт-специфическая нуклеаза	Гомологичная рекомбинация, система CRISPR/SpCas9
Способ доставки сайт-специфической нуклеазы	Электропорация плазмидной ДНК pX458-AAVS1 в ИПСК
Внесенный в клетки генетический материал	ICGi022-A-6: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TTTV) ICGi022-A-7: Neo-M2rtTA/Puro-AsCas12a (TYCV)
Метод анализа внесенной модификации	ПЦР, Вестерн-блот
Способ оценки нецелевой активности	Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, содержащих предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных телец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Платформа для создания моделей наследственных заболеваний на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и системы CRISPR/Cas12a
Способ культивирования	На слое митотически инактивированных фибробластов
Среда культивирования	KnockOut DMEM (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37
Концентрация CO_2, %	5
Концентрация O_2, %	20
Способ пересева	TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific)
Кратность пересева	1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A-6 https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A-7
Дата паспортизации/депонирования	06/07/2023

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

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

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

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

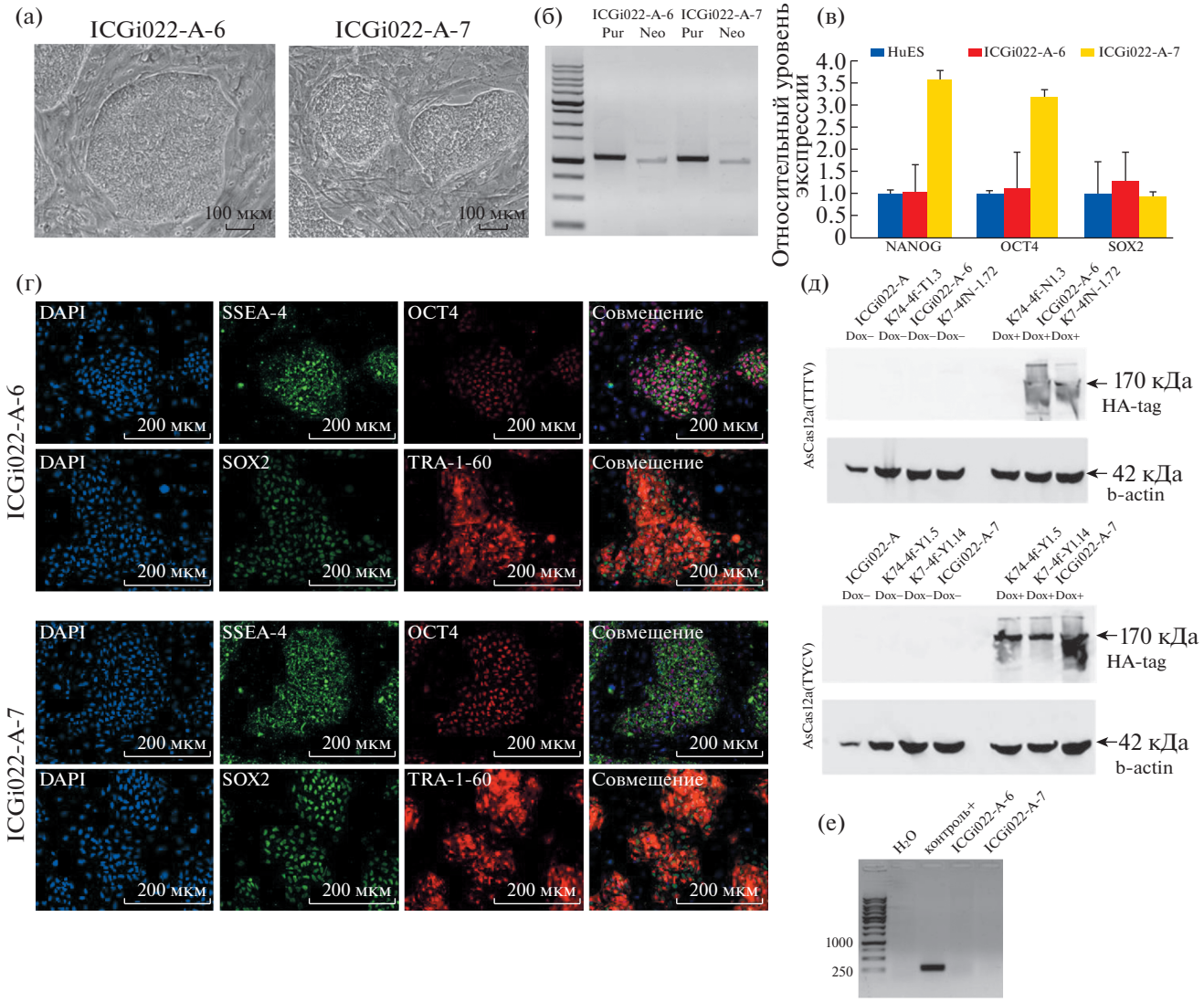

Рис. 2. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, несущих в локусе *AAVS1* доксициклин-управляемые трансгены двух вариантов нуклеазы AsCas12a, распознающих консенсусы PAM 5'-TTTV-3' и 5'-TYCV-3'. (а) Морфология клеток линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, растущих на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. (б) ПЦР-анализ наличия трансгенов Neo-M2rtTA (Neo) и Puro-AsCas12a (Pur) в геномах линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7, ДНК маркер Sky-High (“Биолабмикс”, Россия). (в) Уровень экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2) в ИПСК линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 относительно уровня экспрессии генов линии ЭС клеток HuES9. (г). Иммунофлуоресцентная окраска клеток линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 на маркеры плюрипотентности OCT4 (красный), SOX2 (зеленый), SSEA-4 (зеленый), TRA-1-60 (красный). (д) Вестерн-блот анализ экспрессии белков AsCpf1, (несущих 3×HA тройной гемагглютининовый эпитоп) в отсутствии и присутствии доксициклина (Dox–/Dox+) с помощью антител, выявляющих гемагглютининовый эпитоп (HA-tag), (внутренний позитивный контроль с антителами на бета-актин (b-act)): линии ИПСК с внесенной нуклеазой AsCpf1(TTTV) – K7-4f-N1.3, ICGi022-A-6 (K7-4f-N1.26), K7-4f-N1.72; линии ИПСК с внесенной нуклеазой AsCpf1(TYCV) – K7-4f-Y1.5, K7-4f-Y1.14, ICGi022-A-7 (K7-4f-Y1.17). ИПСК ICGi022-A – исходная линия, не несущая трансгены AsCpf1. (е) ПЦР-тест на контаминацию линий ИПСК ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7 микоплазмой.

лами к HA-эпитопу выявляются белки ожидаемого молекулярного веса 157.8 кДа (рис. 2д). В контрольных образцах трансгенных ИПСК, культивированных без добавления доксициклина, и исходной ИПСК данные белки не выявляются. Таким образом, было показано, что система экспрессии программируемых нуклеаз в трансгенных клонах ИПСК человека является доксициклин-зависимой. По данным ПЦР-скрининга и Вестен-блот анализа для дальнейшей работы и регистрации в базе данных Human Pluripotent Stem Cell Registry (https://hpscreg.eu/) были вы-

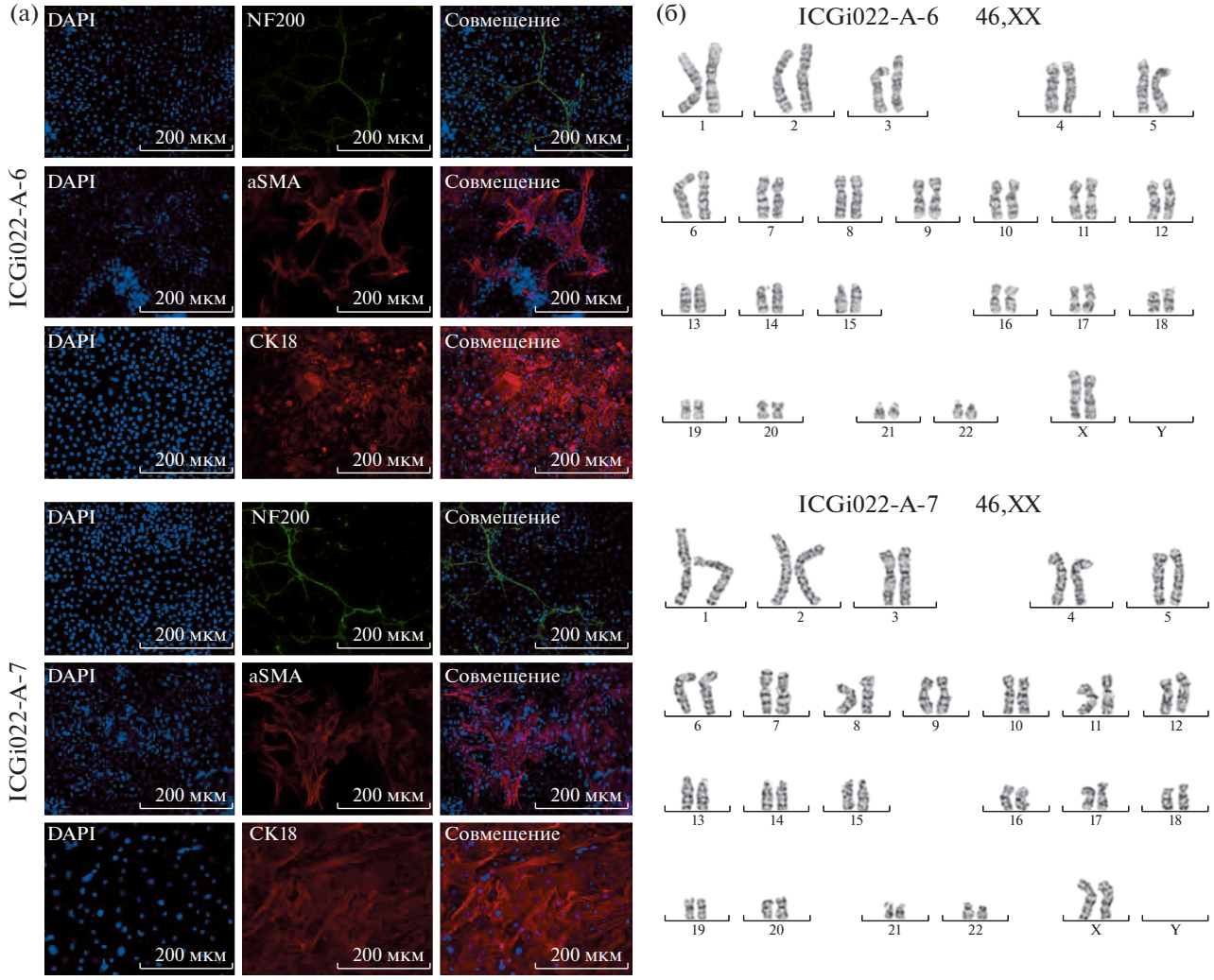

Рис. 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7. (а) Иммунофлуоресцентная окраска на маркеры трех зародышевых листков эктодермы (NF200), мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), энтодермы (цитокератин 18 (CK18)). (б) Анализ кариотипа линий ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7.

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

Во время экспериментов по трансгенезу ИПСК подвергались воздействию на геномы, клонированию и множественному пассированию. В связи с этим необходимо было подтвердить, что трансгенные клоны ИПСК сохранили плюрипотентный статус. Было показано, что полученные трансгенные клоны демонстрируют характерную для плюрипотентных стволовых клеток человека морфологию (рис. 2а). С помощью обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени была проанализирована экспрессия основных генов системы поддержания самообновления плюрипотентных клеток – *NANOG*, *OCT4* и *SOX2*. Было показано, что во всех клонах трансгенных ИПСК наблюдается высокий уровень транскрипции данных генов, сравнимых с уровнем экспрессии в эмбриональных стволовых клетках человека (линия HUES9, Cowan et al., 2004) (рис. 2в).

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

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

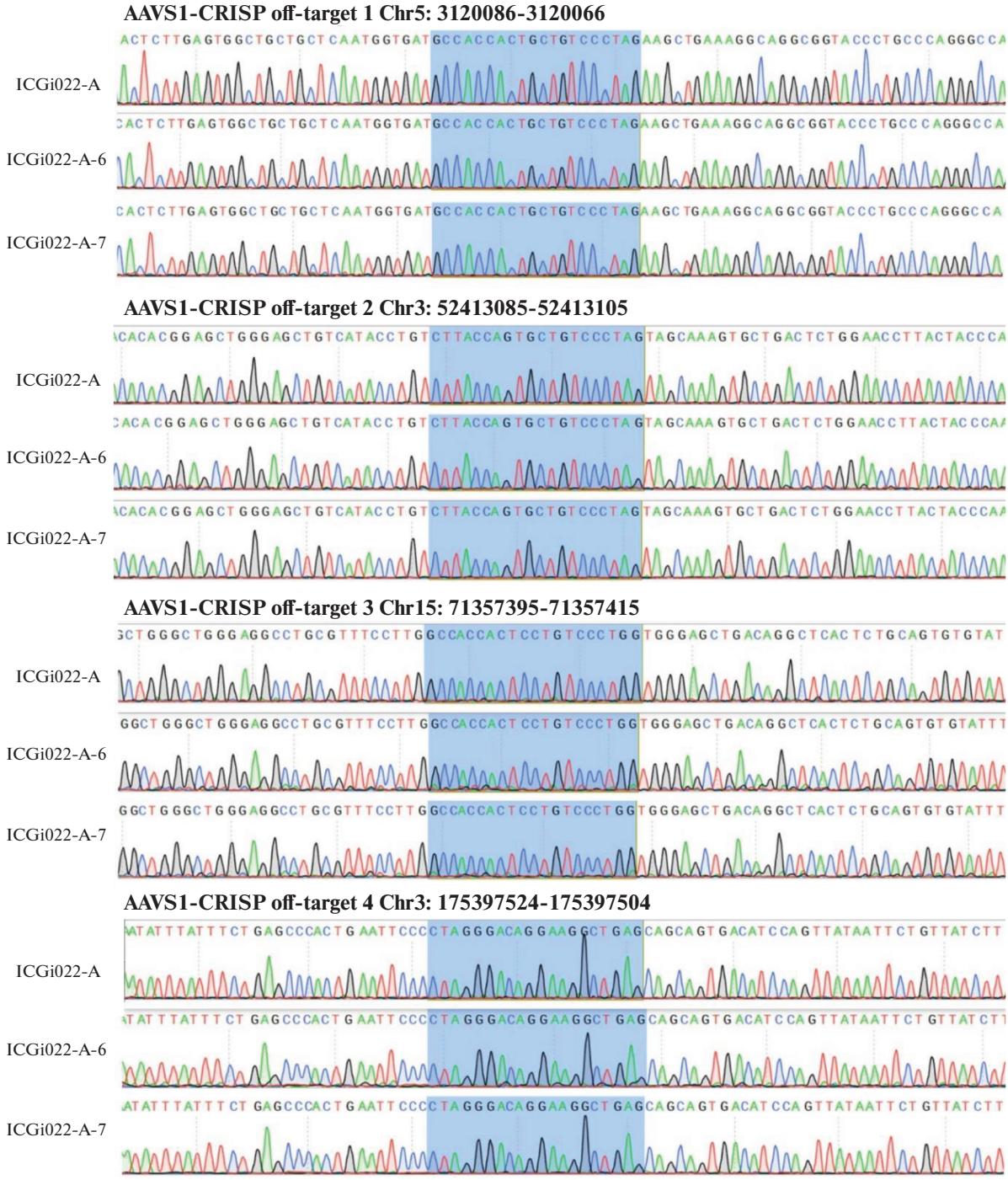

Рис. 4. Анализ нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в геномах линий ИПСК человека ICGi022-A-6 и ICGi022-A-7.

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

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

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

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

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

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Медведев С.П., Маланханова Т.Б., Валетдинова К.Р., Закиян С.М. Создание и исследование клеточных моделей наследственных нейродегенеративных заболеваний с помощью направленного редактирования геномов // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 4. С. 313–319.

Устьянцева Е.И., Медведев С.П., Ветчинова А.С. и др. Платформа для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически кодируемых биосенсоров // Биохимия. 2019. Т. 84. № 3. С. 423–435.

Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.

DeKelver R.C., Choi V.M., Moehle E.A. et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome // Genome Res. 2010. V. 20. № 8. P. 1133–1142.

Gao L., Cox D.B.T., Yan W.X. et al. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. № 8. P. 789–792.

Grigor’eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A. et al. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // Cytotechnology. 2020. V. 72. P. 649–663.

Hellemans J., Mortier G., De Paepe A. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data // Genome Biol. 2008. V. 8. P. R19.

Kim D., Kim J., Hur J.K. et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 8. P. 863–868.

Kleinstiver B.P., Tsai S.Q., Prew M.S. et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 8. P. 869–874.

Malakhova A.A., Grigor’eva E.V., Pavlova S.V. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // Stem Cell Res. 2020. V. 48. P. 101952.

Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // Nat. Protoc. 2013. V. 8. № 11. P. 2281–2308.

Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // Cell. 2015. V. 163. № 3. P. 759–771.

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

S. V. Pavlova[1, 2, 4], K. R. Valetdinova[1], T. B. Malankhanova[1], D. E. Polivtsev[1, 3], A. A. Malahova[1, 2, 4], E. V. Grigor'eva[1, 2, 4], A. I. Shevchenko[1, 2, 4], S. M. Zakian[1, 2, 4], and S. P. Medvedev[1, 2, 4, *]

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

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

[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

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

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

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

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