ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 6, с. 397–404

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

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

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

[a] *Институт цитологии и генетики СО РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия*

[c] *Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Набережная р. Ушайки, 10, Томск, 634050 Россия*

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

Поступила в редакцию 08.07.2023 г.
После доработки 09.10.2023 г.
Принята к публикации 10.10.2023 г.

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

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

Генные мутации и делеции гена *UBE2A* могут вызывать редкое генетическое заболевание – синдром Насименто у мужчин, влияющий как на умственное развитие, так и на фенотипические признаки (Nascimento et al., 2006, Thunstrom et al., 2015). Женщины-носительницы делеций, включающих ген *UBE2A*, обычно здоровы, но имеют экстремально смещенную инактивацию Х-хромосомы. У пациентов-носителей делеции, помимо серьезной степени умственной отсталости, наблюдаются пороки сердца и мочеполовой системы (Thunstrom et al., 2015). Влияние делеции Xq24 на эмбриолетальность было описано нами впервые (Tolmacheva et al., 2020).

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ИПСК и условия культивирования

Фибробласты были получены от пациентки с микроделецией в Xq24, затрагивающей ген *UBE2A* (Tolmacheva et al., 2020). Фибробласты TAF15 выделяли и культивировали как описано ранее (Nikitina et al., 2018a, 2018b). Для репрограммирования фибробластов использовали электропорацию набором эписомных векторов (по 500 нг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28, mp53DD и EGFP (Okita et al., 2013) с помощью Neon Transfection System с параметрами 1650 В, 10 мс, три импульса (Thermo Fisher Scientific). В течение недели клетки культивировали в среде для фибробластов, затем пересаживали на инактивированные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидер) в среду на основе нокаутного заменителя сыворотки и FGF2 человека (Chechetkina et al., 2022). Колонии ИПСК пересаживали механически с добавлением в день пересадки ингибитора Rho-ассоциированной протеин киназы Y-27632 (Abcam). Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO_2.

Выделение ДНК и РНК

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

ПЦР, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ

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

Кариотипирование

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

Спонтанная дифференцировка in vitro

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

Иммунофлуоресцентное окрашивание

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

STR-анализ

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика клеточной линии

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

ОБСУЖДЕНИЕ

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

Таблица 1. Антитела и праймеры

	Антитела			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Маркеры плюрипотентности	Rabbit anti-OCT4	1 : 500	Cell Signalling, 2750	RRID: AB_823583
	Rabbit anti-NANOG	1 : 500	Cell Signaling, 4903	RRID: AB_10559205
Вторичные антитела	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 546	1 : 200	Thermo Fisher Scientific, A-11010	RRID: AB_2534077

	Праймеры		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	*oriP*	544 п.н.	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Детекция эписомных векторов	*EBNA-1*	666 п.н.	ATCGTCAAAGCTGCACACAG/ CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA
Детекция микоплазмы	*Myco1*	280 п.н.	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
Детекция микоплазмы	*Myco2*	206 п.н.	GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC/ GGTTATTCGATTTCTAAATCGCCT
Детекция микоплазмы	*Myco3*	170 п.н.	ATACATGCATGTCGAGCGAG/ CATCTTTTAGTGGCGCCTTAC
Детекция микоплазмы	*Myco4*	407 п.н.	CATGCAAGTCGGACGAAGCA/ AGCATTTCCTCTTCTTACAA
Подтверждение делеции, контрольный ген (ПЦР-РВ)	*HEXB*	136 п.н.	CCGGGCACAATAGTTGAAGT/ TCCTCCAATCTTGTCCATAGC
Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)	*UBE2A*	92 п.н.	CAAAGCTGGCGTGATTGTTG/ GGAGTAGGGAGGTGACAAACA
Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)	*SEPTIN6*	112 п.н.	GACACCCTGTTCAACACCAAA/ GCTTTAGCCTCACGTTGCTC
Ген домашнего хозяйства	*GAPDH*	153 п.н.	GTGGACCTGACCTGCCGTCT/ GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Маркер плюрипотентности	*NANOG*	110 п.н.	AAAGAATCTTCACCTATGCC/ GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
Маркер плюрипотентности	*OCT4*	128 п.н.	CTGGGTTGATCCTCGGACCT/ CACAGAACTCATACGGCGGG
Маркер эктодермы	*SOX1*	133 п.н.	CACAACTCGGAGATCAGCAA / GGTACTTGTAATCCGGGTGC
Маркер эктодермы	*MAP2*	212 п.н.	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG/ CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG
Маркер мезодермы	*FLK1*	131 п.н.	TGATCGGAAATGACACTGGA/ CACGACTCCATGTTGGTCAC
Маркер мезодермы	*MSX1*	307 п.н.	CGAGAGGACCCCGTGGATGCAGAG/ GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG
Маркер энтодермы	*FOXA2*	122 п.н.	GGAGCGGTGAAGATGGAA/ TACGTGTTCATGCCGTTCAT
Маркер энтодермы	*AFP*	136 п.н.	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT/ GCCACAGGCCAATAGTTTGT

Таблица 2. Паспорт линии ИПСК iTAF15Xsk4

Уникальный идентификатор	iTAF15Xsk4
Альтернативное название линии	iTAF15Xsk4
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия; Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (протокол № 10 от 15.02.2021)
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 29 Пол: F Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Фибробласты кожи
Дата забора биоматериала	Ноябрь 2019 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих генетических конструкций	ПЦР, детектируются
Заболевание	Привычное невынашивание беременности
Ген/локус	arr[hg19] Xq24(118555586_118794279)×1mat по данным хромосомного микроматричного анализа лимфоцитов периферической крови пациентки с использованием ДНК-микроматриц SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K Microarray Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (микроделеция в Xq24, затрагивает восемь генов: *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *STEEP1*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPTIN6* и *MIR766*)
Морфология	Эмбриональные стволовые клетки человека (праймированные)
Плюрипотентность	Подтверждена в тесте на формирование эмбриоидных телец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Изучение синдрома дефицита гена *UBE2A*
Способ культивирования	Монослойный на пластике, покрытом фидером
Среда культивирования	DMEM/F12, 20% KSR, NEAA, GlutaMAX, PenStrep, 2-mercaptoethanol, bFGF
Температура, °C	37
Концентрация CO_2, %	5
Концентрация O_2, %	20
Способ пересева	Механический
Кратность пересева	1 : 2–1 : 6
Криоконсервация	90% KSR, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL/entities/221
Дата паспортизации/депонирования	26/08/2022

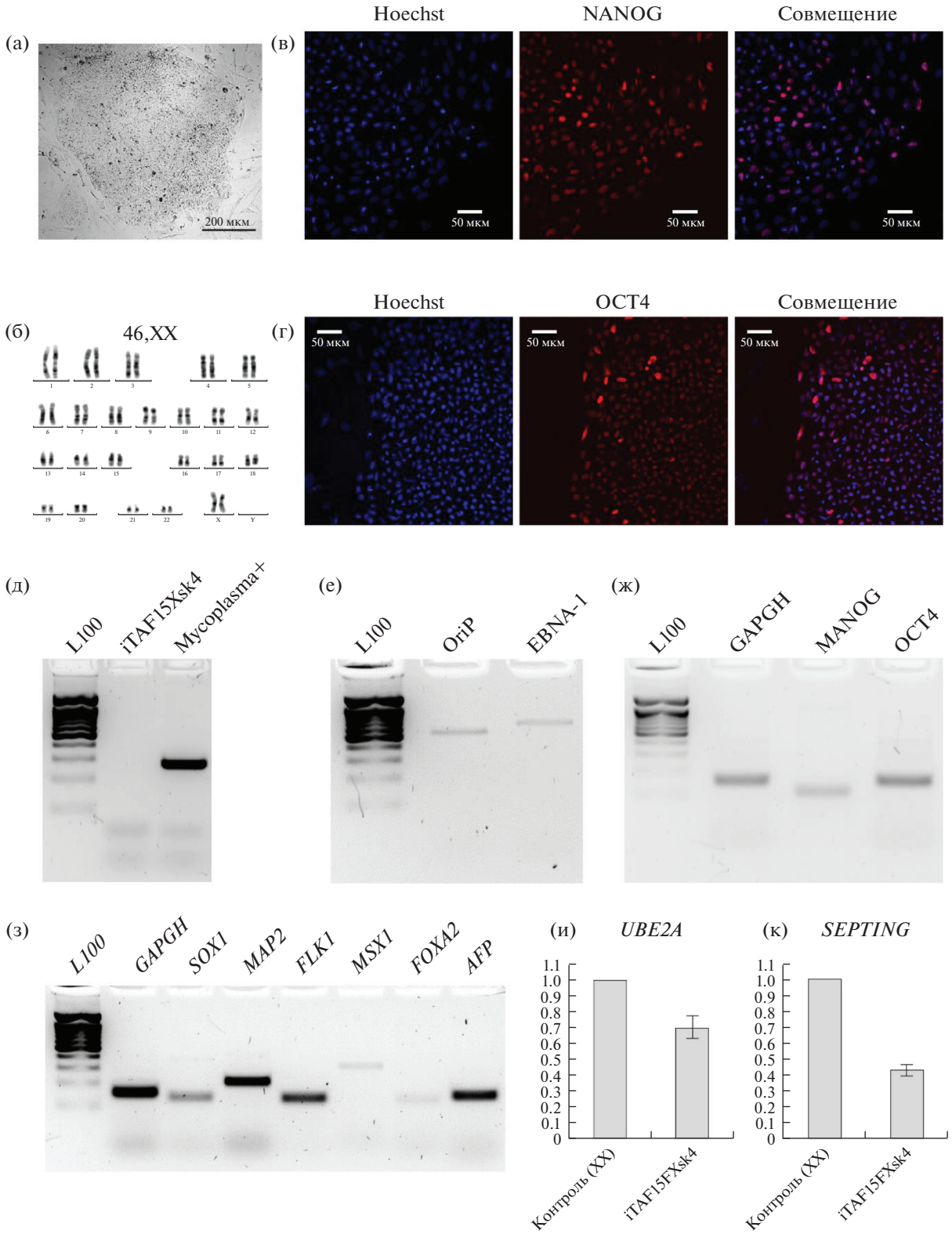

Рис. 1. Характеристика линии ИПСК iTAF15Xsk4. (а) Морфология колонии; (б) метафазная пластинка на пассаже 10; (в) иммуноцитохимическое окрашивание на NANOG; (г) иммуноцитохимическое окрашивание на OCT4; (д) ПЦР анализ на контаминацию микоплазмой; (е) ПЦР анализ присутствия эписом; (ж) ОТ-ПЦР анализ на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

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека iTAF15Xsk4

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

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

Полученную линию ИСПК в дальнейшем можно будет использовать для изучения эффекта делеции гена *UBE2A*. Также, потенциально, ИПСК можно использовать для изучения инактивации Х-хромосомы. Для этого будет необходимо перевести клетки на стадию наивной плюрипотентности, хотя в некоторых работах показана неслучайная инактивация Х-хромосом при дифференцировке “наивных” ИПСК. Также, нужно будет проверить клетки на наличие эрозии инактивации Х-хромосом. Из-за того, что эрозия сохраняется в дифференцированных клетках, линии с эродированной инактивацией Х-хромосомы непригодны для изучения механизмов Х-инактивации (Zhou et al., 2023).

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Chechetkina S.A., Khabarova A.A., Chvileva A.S. et al. Generation of two iPSC lines from healthy donor with a heterozygous mutation in the VPS13B gene // Stem. Cell Res. 2021. V. 59. P. 102648. https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102648

Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // Mol. Cell Probes. 1998. V. 12. № 5. P. 301–308. https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0186

Drozd A.M., Walczak M.P., Piaskowski S. et al. Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system // Stem. Cell Res. Ther. 2015. V. 6. № 1. P. 122. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0112-3

Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. № 11. P. 1269–1275. https://doi.org/10.1038/nbt.1502

Nascimento R.M.P., Otto P.A., de Brouwer A.P.M. et al. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 79. № 3. P. 549–555. https://doi.org/10.1086/507047

Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al. Generation of two iPSC lines (IMGTi001-A and IMGTi001-B) from human skin fibroblasts with ring chromosome 22 // Stem. Cell Res. 2018a. V. 31. P. 244–248. https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.08.012

Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al. Induced pluripotent stem cell line, IMGTi003-A, derived from skin fibroblasts of an intellectually disabled patient with ring chromosome 13 // Stem. Cell Res. 2018b. V. 33. P. 260–264. https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.11.009

Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // Stem Cells. 2013. V. 31. № 3. P. 458–466. https://doi.org/10.1002/stem.1293

Prokhorovich M.A., Lagar'kova M.A., Shilov A.G. et al. Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. V. 144. № 1. P. 126–129. https://doi.org/10.1007/s10517-007-0271-z

Shnaider T.A., Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. et al. Generation of four iPSC lines from two siblings with a microdeletion at the CNTN6 gene and intellectual disability // Stem. Cell Res. 2019. V. 41. P. 101591. https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101591

Thunstrom S., Sodermark L., Ivarsson L. et al. UBE2A deficiency syndrome: a report of two unrelated cases with large Xq24 deletions encompassing UBE2A gene // Am. J. Med. Genet. A. 2015. V. 167A. № 1. P. 204–210. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36800

Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P. et al. Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from UBE2A deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // Cytogenet. Genome Res. 2020. V. 160. № 5. P. 245–254. https://doi.org/10.1159/000508050

Zhou J., Hu J., Wang Y. et al. Induction and application of human naive pluripotency // Cell Rep. 2023. V. 42. № 4. P. 112379. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112379

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

I. E. Pristyazhnyuk[1], N. I. Meshcheryakov[1, 2], T. V. Nikitina[3], A. A. Kashevarova[3], D. A. Fedotov[3], E. N. Tolmacheva[3], L. I. Minaycheva[3], L. P. Nazarenko[3], I. N. Lebedev[3], and A. G. Menzorov[1, 2, *]

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

[2]Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

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

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

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

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