

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 577.21

Рег. № НИОКТР АААА-А20-120073190041-2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
СПбГУ

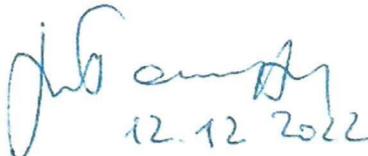
С.В. Микушев
«19» декабря 2022 г.



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

НЕВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА
ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ
(заключительный)

Руководитель НИР,
профессор,
доктор биологических наук

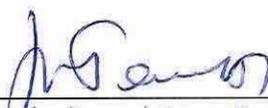

12.12.2022
подпись, дата

А.Н. Томилин

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ:

Руководитель темы,
д-р биол. наук, чл. корр.
РАН, проф., зав.
лабораторией клеточной и
молекулярной биологии
Институт трансляционной
медицины СПбГУ



(подпись) 17.11.2022

Томилиן А.Н.
(руководство,
планирование
экспериментов, написание
статей и отчёта)

Исполнители:

Вед. научн. сотр., канд.
биол. наук Институт
трансляционной медицины
СПбГУ



(подпись) 17.11.2022

Синенко С.А.
(планирование и
проведение экспериментов,
написание статей и отчета)

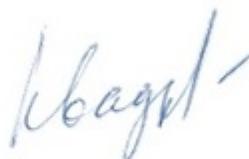
Ст. научн. сотр. Институт
трансляционной медицины
СПбГУ



(подпись) 17.11.2022

Старкова Т.Ю.
(проведение
экспериментов, написание
статей и отчета)

Нормоконтроль



30.11.2022

Н.В. Квадрициус

РЕФЕРАТ

Отчёт 46 стр., 1 кн., 8 рис., 47 источн.

ИСКУССТВЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА, ГЕМОФИЛИЯ, ФАКТОР СВЁРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ОПОСРЕДОВАННЫЙ МИКРОКЛЕТКАМИ ПЕРЕНОС ХРОМОСОМ, РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Объектами работы являются конструкции альфоидной^{TetO}-искусственной хромосомы человека (ИХЧ) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши, мутантные по гену фактора свёртывания крови VIII (FVIII).

Целью работы было – конструирование новых векторов на основе альфоидной^{TetO}-ИХЧ, содержащих трансгены фактора свертываемости FVIII и создании генотерапевтической модели с использованием данных конструкций и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши мутантных по соответствующим генам.

В ходе работы впервые были получены конструкции альфоидной^{TetO}-ИХЧ, содержащей трансгены фактора свертываемости FVIII, а также дисферлина и получены ИПСК мыши мутантные по данным генам. С помощью ММСТ метода альфоидная^{TetO}-ИХЧ, содержащая FVIII была перенесена в ИПСК мыши. В ходе работы была охарактеризована митотическая стабильность альфоидной^{TetO}-ИХЧ, несущей FVIII трансген, в ИПСК мыши, и было показано, что данная ИХЧ конструкция имеет недостаточную митотическую стабильность для ее использования в генотерапевтических целях в мышинной модели лечения моногенного заболевания (гемофилия А). Было проведено субклонирование данных ИПСК с целью поиска клонов, в которых данная ИХЧ могла иметь большую митотическую стабильность. В результате работы был сделан вывод о значительных недостатках альфоидной^{TetO}-ИХЧ для использования ее как терапевтического вектора и предложено, что альфоидная-ИХЧ, не содержащая TetO последовательности может иметь свойства наиболее подходящие для генотерапевтических целей. В данной работе мы также провели анализ литературных данных по всем видам искусственных хромосом, разработанных к настоящему времени, и обсудили их использование в генной терапии. Данная работа является первой попыткой смоделировать на лабораторных мышах терапевтический цикл лечения моногенного заболевания (гемофилия А) с помощью пациент-специфичных ИПСК и альфоидной^{TetO}-ИХЧ в качестве генетического экспрессионного вектора.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	3
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Цели и задачи.....	9
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЁТА О НИР.....	10
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	10
Культивирование клеток.....	10
Молекулярное клонирование.....	11
Молекулярное клонирование новой конструкции, содержащей FVIII-IRES-GFP.	11
Трансфекция клеток линии СНО.....	12
Сборка лентивирусов.....	12
Иммуноблоттинг.....	13
Выделение геномной ДНК и ПЦР.....	14
Приготовление метафазных пластинок.....	14
Флуоресцентная гибридизация in situ.....	15
Выделение фибробластов из кончика хвоста мыши.....	16
Репрограммирование фибробластов мыши в ИПСК.....	17
Получение тератом и анализ гистологических срезов.....	17
Перенос ИХЧ из клеток линии СНО в ИПСК мыши.....	18
Отбор ИПСК мыши с помощью проточной цитофлуорометрии.....	19
Иммуноцитохимия.....	19
Анализ митотической стабильности FVIII-альфоидной ^{TetO} -ИХЧ в ИПСК.....	20
Субклонирование мышинных ИПСК.....	20
Лабораторные животные.....	21
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	22
Сборка векторов для доставки терапевтического гена в альфоидную ^{TetO} -ИХЧ.....	22
Встраивание трансгенов в альфоиднуюTetO-ИХЧ с помощью cre/lox-рекомбинации.....	23
Получение ИПСК из фибробластов мышей нокаутной по гену FVIII линии.....	28
Перенос терапевтической альфоиднойTetO-EF1- α -FVIII-ИХЧ из клеток линии СНО в FVIII-/--ИПСК мыши с помощью метода ММСТ.....	29
Характеристика мышинных FVIII-/--ИПСК, содержащих альфоиднуюTetO-EF1- α -FVIII-ИХЧ.	29
Мышиные FVIII-/--ИПСК, содержащие альфоиднуюTetO-EF1- α -FVIII-ИХЧ.....	33

Анализ функциональной активности белка FVIII, экспрессирующегося с ИХЧ.....	33
Анализ митотической стабильности FVIII-альфоиднойTetO-ИХЧ в ИПСК.....	34
Отбор линий ИПСК с повышенной стабильностью ИХЧ.....	38
ОБСУЖДЕНИЯ.....	40
Влияние альфоиднойTetO-FVIII-ИХЧ на плюрипотентные свойства мышинных ИПСК....	40
Особенности экспрессии трансгенов в полученных клетках и модификация генетической конструкции.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	45

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- ИХЧ – искусственная хромосома человека;
- ИХБ – искусственная хромосома бактерий;
- ИХД – искусственная хромосома дрожжей;
- ММСТ – перенос хромосом, опосредованный микроклетками (Microcell-Mediated Chromosome Transfer);
- FVIII – фактор свёртываемости крови VIII
- TAR –рекомбинация, ассоциированная с трансформацией;
- CENP-B – центромерный белок B;
- ЭСК – эмбриональные стволовые клетки;
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;
- СНО – клетки яичника китайского хомячка;
- tetO – тетрациклиновый оператор;
- HSV-1 – вирус простого герпеса типа 1;
- HVJ-E – японский гемагглютинирующий вирус E;
- MLV – ретровирус лейкоза мышей;
- TACF – теломер-ассоциированная фрагментация хромосом;
- ПЭГ – полиэтиленгликоль;
- HPRT – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза;
- FACS – проточная цитометрия (fluorescence-activated cell sorting);
- GFP – зеленый флуоресцентный белок.
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
- ПЦР – полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Для доставки генов в клетки используют генетические экспрессионные векторные конструкции. На сегодняшний день разработано множество векторных систем, различающихся по основным характеристикам: (1) способности встраиваться в хромосомы хозяйских клеток или оставаться в эписомной форме, (2) генетической емкости, определяющей максимальный размер трансгена, и (3) способу доставки. Интегрирующие векторы встраиваются в ДНК клеток-хозяев, в результате чего они наследуются дочерними клетками. К недостаткам таких векторных систем относятся случайный характер их встраивания в геном, ассоциированный с риском инсерционного мутагенеза, а также эпигенетическим подавлением экспрессии трансгенов. Интегрирующими векторами являются линейаризованные плазмиды, а также векторные системы на основе ретровирусов [1,2]. Для создания таких векторов используют генетические последовательности, как интегрирующих в геном хозяина вирусов (ретровирусы, в т. ч. лентивирусы), так и не интегрирующих (аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, альфавирусы, герпесвирусы, бакуловирусы, поксвирусы, бактериофаги). Доставка таких векторов называется трансдукцией и происходит с помощью характерного для данного вируса механизма заражения клеток хозяина. 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, интегрирующих в геном хозяина) и эпигенетическое глушение. Существуют также генетические вектора на основе ДНК транспозонов (такие векторные системы как piggy-Bac, Sleeping Beauty, Tol2 и др.), которые позволяют доставлять в клетки ДНК длиной до 9 т.п.о. [3–5]. Доставка транспозонов в клетки может осуществляться теми же методами трансфекции, которые используют для доставки плазмид. 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 (ИХД или YAC – Yeast Artificial Chromosomes) [6]. В 1989 году на основе F-плазмиды была разработана искусственная хромосома бактерий

(ИХБ или ВАС – Bacterial Artificial Chromosome) [7] и в 1990 году была описана искусственная хромосома на основе ДНК бактериофага P1 (РАС – P1-derived Artificial Chromosome) [8]. Конструкции ВАС и РАС являются кольцевыми векторами, в которые можно загружать генетические фрагменты длиной до 300 т.п.о. ИХД является линейным вектором, в который можно загрузить трансген длиной до 1 млн п. о. ИХБ и РАС вектора обычно используют для получения необходимых генетических конструкций в бактериях, тогда как ИХД используют в основном в дрожжевых клетках. При переносе данных искусственных хромосом в клетки высших эукариот, они спонтанно встраиваются в геном хозяина или теряются в процессе клеточных делений.

Искусственные хромосомы человека (ИХЧ или НАС, human artificial chromosomes) были получены, в первую очередь, в качестве экспрессионных векторных систем для переноса трансгенов большой величины в эукариотические клетки. ИХЧ – это векторные конструкции, обладающие основными характеристиками хромосом: способностью автономного существования в клетке как дополнительной хромосомы и реплицироваться, и передаваться обеим дочерним клеткам в процессе клеточного деления. Таким образом, использование ИХЧ позволяет избежать рисков инсерционного мутагенеза и при этом обеспечивает устойчивую экспрессию трансгенов. Уникальной особенностью ИХЧ является их сверхвысокая емкость, позволяющая осуществлять перенос трансгенов длиной до нескольких миллионов пар нуклеотидов, в том числе целых генных локусов. На сегодняшний день в разных лабораториях разработаны различные варианты искусственных хромосом человека [9–14]. ИХЧ получают с помощью двух подходов. Первый – это так называемый подход «сверху-вниз» (англ. top-down), который позволяет получать ИХЧ из нативных хромосом путем их максимальной редукции, не затрагивающей только компоненты, необходимые для стабильной репликации в клетке, а именно, центромерный и теломерные участки [15,16]. Второй подход – синтетический, «снизу-вверх» (англ. bottom-up) – позволяет получать линейные или кольцевые ИХЧ посредством синтеза и сборки больших участков прицентромерной альфа-сателлитной ДНК *in vitro* [17,18]. Данные подходы позволяют получать митотически устойчивые векторные конструкции, способные вмещать большие по длине фрагменты ДНК и обеспечивать стабильную экспрессию трансгенов, будучи при этом автономными, не встраиваемыми в хромосомы клеток генетическими элементами. Необходимо отметить, что несмотря на очевидные преимущества ИХЧ перед другими векторными системами, существует ряд технических ограничений для их активного использования как в фундаментальных, так и биомедицинских исследованиях.

На сегодняшний день одной из наиболее охарактеризованных искусственных хромосом является альфоидная^{Tet^O}-ИХЧ [19], однако её изучение в целях разработки генотерапевтических подходов лечения генетических заболеваний находится на начальном этапе. В нашей работе мы исследовали данную ИХЧ как генотерапевтический вектор в моделировании генной коррекции на основе индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПСК) мыши.

Цели и задачи

Целью работы является конструирование векторов на основе альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ, содержащих трансгены фактора свертываемости крови FVIII и их апробация в генотерапевтической тканезаместительной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши мутантных по соответствующим генам.

Задачи:

- 1) Из нокаутных FVIII^{-/-} мышей выделить фибробласты и репрограммировать их в ИПСК.
- 2) С помощью методов молекулярного клонирования сконструировать плазмиды для встраивания гена FVIII в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ.
- 3) Произвести встраивание трансгенов в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ.
- 4) Произвести перенос терапевтических альфоидных^{Tet^O}-ИХЧ в ИПСК мыши.
- 5) Оценить плюрипотентные свойства FVIII^{-/-} ИПСК мыши, содержащих терапевтическую альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ, а также уровень экспрессии в них трансгена FVIII.
- 6) Провести оценку митотической стабильности и стабильности экспрессии трансгенов альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ в ИПСК мыши.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЁТА О НИР

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки яичников китайского хомячка (линия CHO), дефицитные по гену гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT) и содержащие альфоидную^{TetO}-ИХЧ, 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 мМ L-глутамин (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), а также 10 мкг/мл бластицидина S (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Мышиные фибробласты 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 мМ L-глутамин и 0,25 мкг/мл фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Для культивирования ИПСК 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 мМ L-глутамин, 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). ИПСК растили на чашках, покрытых желатином.

Для снятия клеток с чашек, после отбора культуральной среды, клетки промывали фосфатным буфером PBS и инкубировали в 0,05% растворе трипсина (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) в течение 3 мин при температуре +37°C, после чего трипсин ингибировали содержащей фетальную сыворотку культуральной средой и осаждали клетки в центрифуге в течение 3 мин при скорости 1200 об./мин.

Живые клетки сохраняли в замороженном состоянии (при температуре -80°C для хранения не дольше месяца или в жидком азоте для более длительного хранения) в специальной среде следующего состава: 70% среды DMEM (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), 18% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США) и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (Хеликон, Москва, Россия).

Молекулярное клонирование

Синтез и клонирование в вектор pUC57 кодон-оптимизированной кДНК FVIII производился компанией GenScript (Piscataway, Нью Джерси, США). Эту кДНК (7080 п.о.) вырезали с помощью ферментов XhoI и NheI (New England Biolabs, Ипсвич, США) и встраивали его по сайтам AvrII и SalI в плазмиду pCMV-tDNA-IL2RG (ранее клонированную в нашей лаборатории на основе вектора tTS-IRES_DsRed2 [19] [20]), содержащую в качестве инсуляторов последовательность тДНК – кластер генов транспортной РНК (тРНК). 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 инсулятор cHS4, был вырезан из плазмиды pEF1-alpha-cHS4-IL2RG-DsRed (ранее клонированную в нашей лаборатории на основе вектора tTS-IRES_DsRed2 [20]) 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. Лигирование проводили с помощью лигазы T4 (Евроген, Москва, Россия). Полученный вектор был обозначен, как pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII.

Молекулярное клонирование новой конструкции, содержащей FVIII-IRES-GFP

С целью совершенствования генетической конструкции pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII, а именно предполагаемого повышение уровня экспрессии трансгенов FVIII и GFP контролируемого промотором EF1-альфа осуществляли модификацию путем удаления части CAG промотора (инактивация CAG-GFP) и встраивание последовательности IRES-EGFP после последовательности FVIII. Плазмиду pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII резали рестриктазами NruI и SgrAI (удаление CAG промотора), производили тупление концов вектора и лигировали стандартным методом. Полученную плазмиду pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII (CAG-) резали по сайтам BstBI и PmeI чтобы легировать с последовательностью IRES-GFP-bov-glo-polyA2A. С помощью ПЦР амплифицировали последовательность BstBI-IRES-GFP-bov-glo-polyA2A-PmeI с плазмиды pIRES2-EGFP.

Праймеры: BstBI-IRES-GFP-Fw: tatttcgaaAAGCTTCGAATTCTGCAGTC (53,2; 57,7); PmeI-Sv40-Rev1: tatgtttaaacTAAGATACATTGATGAGTTTGGACA (52,1; 56,8) (плазмида ires-

GFP). Также с целью клонирования красного флуоресцентного белка (DsRed), BstBI-IRES-GFP-bov-glo-polyA2A-PmeI последовательность амплифицировали с помощью ПЦР п с плазмиды p264-EF1-hIL2RG-DsRed-pA. Праймеры: BstBI-Ires-DsRed-Fw: tatttcgaaTTTAACCCGGGTAААТТССG (52,7; 57,4); PmeI-Sv40-Rev: tatgtttaaacGGATCCTAAGATACATTTGATGAGTT (52,2; 57,7). ПЦР-продукты резали по сайтам BstBI и PmeI и очищали с помощью коммерческого набора (Евроген). Полученные очищенные фрагменты основного вектора pEF1-alpha-chS4-tDNA-optFVIII (CAG-) и IRES-GFP-bov-glo-polyA2A лигировали. Полученные клоны плазмид pEF1-alpha-chS4-tDNA-optFVIII-IRES-GFP-bov-glo-polyA2A (CAG-) анализировали с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

Трансфекция клеток линии СНО

За день до трансфекции 30 тыс. клеток линии СНО, содержащих ИХЧ (СНО 38.18) высевали на лунку 24-луночного планшета. В день трансфекции среду для культивирования СНО клеток заменяли на 250 мкл среды opti-Mem (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США). В 50 мкл среды opti-Mem смешивали 2 мкг плазмиды, содержащей ген FVIII, 500 нг плазмиды pMC-Cre, содержащей ген Cre-рекомбиназы и 5 мкл реактива Липофектамин 2000 (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США). Раствор смешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и добавляли в лунку с клетками СНО. Через 6 ч среду opti-Mem заменяли на среду для культивирования клеток СНО. Через 48 ч клетки пересевали 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 мышинных фибробластов, а также для осуществления переноса ИХЧ с помощью метода ретро-ММСТ были собраны лентивирусы, содержащие гены факторов плюрипотентности: Oct4, Sox2, Klf4, c-Мyc (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) [21], EnvΔR-IRES-

TdTomato [22] (10 мкг) с помощью кальций-фосфатной трансфекции или гидрохлорида-полиэтиленимина (PEI – polyethylenimine hydrochloride) (Polysciences, Уоррингтон, США). При кальций-фосфатной трансфекции смешивали 32,5 мкл буфера трис-ЭДТА и 87,5 мкл 2М хлорида кальция, а также плазмиды: pMD2.G (2,5 мкг), psPAX2 (7,5 мкг) и tetO-FUW-OSKM или FUW-M2rtTA (10 мкг). Доводили смесь до 600 мкл стерильной дистиллированной водой. После тщательного перемешивания данной смеси на вортексе, в неё аккуратно по капле добавляли 600 мкл 2х буфера HBS (HEPES buffered saline: 280 мМ хлорида натрия, 50 мМ HEPES, 1,5 мМ гидрофосфата натрия, рН 7,1). Полученный раствор инкубировали 15 мин при комнатной температуре и добавляли в среду к клеткам НЕК-293Т. Для трансфекции с помощью PEI в 1 мл среды OptiMem разводили векторные конструкции: pMD2.G (1,7 мкг), psPAX2 (5 мкг) и EnvΔR-IRES-TdTomato (6,7 мкг) и после смешивания вортексом добавляли 15 мкл раствора PEI с концентрацией 1 мкг/мкл. После вторичного смешивания вортеком, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и раскапывали на 10 см чашку с клетками НЕК 293, содержащихся в стандартной для них среде.

Иммуноблоттинг

Клетки выращивали на 6-луночном планшете до 100% плотности покрытия, затем промывали фосфатным буфером (PBS), снимали с помощью трипсина и лизировали в 1х SDS-буфере (состав 5х SDS буфера: бромфеноловый синий - 0,25%, глицерин – 50%, додецилсульфат натрия (SDS) – 10%, трис-HCl (рН = 6,8) – 0,25 М, дитиотритол (DTT) – 0,5 М). Образцы клеточного лизата наносили на гель (30 мкг тотального белка на дорожку) и разделяли с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Hybond-ECL (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США). Мембрану блокировали 5% раствором сухого молока, разведённого в буфере PBS, содержащем 0,1% детергента Tween20 (Хеликон, Москва, Россия), в течение 30 мин при комнатной температуре. Первичные и вторичные антитела разводили в растворе буфера PBS, содержащем 0,1% Tween20 и 1% сухого молока. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при +4°C. Использовали следующие первичные антитела: овечьи против белка FVIII (Abscam, 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. После инкубации с первичными антителами, мембраны отмывали 3 раза по 5 мин в буфере PBS, содержащем

0,1% Tween20. Затем мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена: ослиные антитела против овечьих, козы антитела против кроличьих и козы антитела против мышинных (Jackson ImmunoResearch, Уэст Гроув, США). Вторичные антитела использовали в разведении 1:4000. После отмывки мембран 3 раза по 5 мин в буфере PBS, содержащем 0,1% Tween20 их 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, выращенные на 24-луночном планшете до 100% плотности покрытия, промывали фосфатным буфером (PBS), снимали с помощью трипсина и лизировали в течение 2 ч при температуре +55°C в 300 мкл (на лунку) раствора следующего состава: 10 mM Трис (pH 7,5), 10 mM ЭДТА, 10 mM хлорид натрия, 0,5% N-лауроилсаркозил, 200 мкг/мл протеиназы К. Затем в раствор добавляли 600 мкл охлаждённого на льду этанола, содержащего 5% ацетата натрия (pH 5,2) и осаждали ДНК в охлаждённой до +4° центрифуге при скорости в 13000 g в течение 15 мин. После отбрасывания супернатанта осадок промывали в 1 мл 70% этанола в центрифуге при скорости в 13000 g в течение 10 мин. После отбрасывания супернатанта осаждённую ДНК высушивали на воздухе и растворяли в 30 мкл дистиллированной воды. Для ПЦР использовали фирменный набор HS-Taq PCR-color mix (Биолабмикс, Новосибирск, Россия). На реакцию ПЦР брали 500 нг геномной ДНК и 10 нг плазмидной ДНК. Для амплификации фрагмента EF1- α -FVIII использовали праймеры: прямой – 5'-acgtcgtctttaggtgggg-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'-ccacgaccaagtgcagcaatg-3', обратный – 5'-cagagacggaatccatccatcgctc-3' (размер ПЦР продукта – 373 п. о.). Плазмида pMS-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 кальцеид (Calcein, Invitrogen, финальная концентрация 0,1 мкг/мл) и продолжали инкубировать клетки ещё 2 ч. Далее клетки снимали с чашек с помощью трипсина и готовили одноклеточную суспензию путём пипетирования. Среду и

отмывочный фосфатный буфер не удаляли из чашки, а собирали вместе с клетками в 50 мл пробирку. Пробирку с содержимым центрифугировали 3 мин 1200 об./мин. После этого жидкость удаляли. Осадок клеток промывали 10 мл фосфатного буфера. Затем, пробирку с содержимым центрифугировали 3 мин 1200 об./мин. Осадок клеток разбивали, несильно ударяя пальцем по нижней части пробирки. К клеткам медленно по капле добавляли 10 мл, подогретого до +37°C, водного 0,56% раствора хлорида калия. Клетки инкубировали в растворе хлорида калия в водяной бане при температуре +37°C, в течение 20 мин. Далее, пробирки с клетками перемещали на лёд и добавляли 10 капель фиксирующего раствора (метанол/уксусная кислота – 3/1), затем перемешивали, переворачивая пробирки с содержимым, несколько раз. Клетки осаждали на скорости 1500 об./мин в течение 5 мин в охлаждённой до +4°C центрифуге. Важно, чтобы центрифуга останавливалась плавно, во избежание потери материала. Супернатант осторожно удаляли, не касаясь осадка. Осадок разбивали, несильно ударяя пальцем по нижней части пробирки. Медленно по капле добавляли 1 мл фиксирующего раствора. Не перемешивали. Оставляли клетки на льду на 30 мин. Осторожно ресуспендировали клетки несильно ударяя пальцем по нижней части пробирки. Осаждали клетки на скорости 1500 об./мин в течение 5 мин в охлаждённой до +4°C центрифуге. Далее, дважды повторяли промывку клеток фиксирующим раствором, но не инкубируя при этом клетки 30 мин на льду. В конце ресуспендировали клетки в 1 мл фиксирующего раствора. В таком виде клетки могут храниться не менее года при температуре -20°C. На подготовленное (см. ниже) предметное стекло капали фиксирующий раствор с клетками с высоты, примерно, 50 см. Высушивали стекло. Убирали препараты в коробку. Приступали к гибридизации не менее чем через сутки, а лучше через 3-5 дней. Приготовленные таким образом препараты, стабильны в течение, как минимум, 1 месяца.

Подготовка стёкол

Предметные стёкла помещали в 6М раствор соляной кислоты, как минимум на 3 ч при комнатной температуре. Стёкла отмывали в проточной воде в течение 10 мин. Стёкла промывали дистиллированной водой.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Препараты метафазных пластинок регидратировали фосфатным буфером в течение 15 мин при комнатной температуре, затем фиксировали в 4% формалине (растворённом в фосфатном буфере) в течение 2 мин и промывали фосфатным буфером 3 раза по 5 мин. Далее препараты дегидратировали при комнатной температуре в течение 5 мин в

следующих растворах последовательно: 70% этанол – 90% этанол – 96 % этанол и высушивали на воздухе. Готовили гибридизационную смесь:

1 мкл – 1М трис (pH 7,2)

70 мкл – 100% формамид

10 мкл - 50% декстран сульфат

5 мкл – PNA-FITC-tetO (ПНК зонд на коровую последовательность альфоидной^{TetO}-ИХЧ) (10 нг) (концентрация стокового раствора – 100 нг) (Panagen Company, Бетел, США)

5 мкл – PNA-TRITS-telomere (ПНК зонд на теломерную последовательность хромосом млекопитающих) (10 нг) (концентрация стокового раствора – 100 нг) (Panagen Company, Бетел, США)

9 мкл – дистиллированная вода

Всего – 100 мкл, на 5 препаратов.

Наносили по 20 мкл гибридизационной смеси на каждый препарат и накрывали покровным стеклом, после чего денатурировали препараты при +80°C на нагревательном столике в течение 3 минут в темноте и инкубировали 2 ч при комнатной температуре в темноте. Убирали покровные стёкла и промывали препараты два раза по 15 мин в следующем растворе: 70% формамид / 10 мМ трис (pH 7,2) / 0,1% бычий сывороточный альбумин. Затем, промывали 3 раза по 5 минут в буфере TBS-T: 19,98 мМ трис (pH 7,4) / 136 мМ хлорид натрия / 80 мкл Tween20 на 100 мл буфера и 2 раза по 2 мин фосфатным буфером. Инкубировали в 2-кратном растворе натрий цитратного буфера (SSC) с добавлением DAPI (конечная концентрация 1 мкг/мл), 5 мин при комнатной температуре и промывали 1 раз в течение 2 мин в 2-кратном натрий цитратном буфере и 1 раз в течение 2 мин фосфатным буфером. Далее дегидратировали препараты при комнатной температуре в течение 5 мин в следующих растворах последовательно: 70% этанол – 90% этанол – 96 % этанол. После высушивания препаратов на воздухе на них наносили заключающую среду Vectashield Antifade Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) и накрывали покровными стёклами.

Хранили препараты не дольше недели при температуре +4°C. Анализ образцов проводили с помощью микроскопа EVOS Cell Imaging Systems Substrate (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

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, Уолтом, США) в течение 20 мин при температуре +37°C. Полученные клетки культивировали в 6 см чашках Петри на среде для мышинных эмбриональных фибробластов с добавлением фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтом, США).

Репрограммирование фибробластов мыши в ИПСК

Для репрограммирования использовали фибробласты, выделенные из кончика хвоста мыши, находящиеся на 3-4 пассажах. Клетки высевали на лунки 6-луночного планшета, покрытые желатином в количестве 200 тыс. клеток на лунку. На следующий день стандартную среду для культивирования заменяли на 600 мкл среды для МЭФ, куда добавляли 100 мкл среды, содержащей вирусные частицы tetO-FUW-OSKM ($2,5 \times 10^6$ Ед./мл) и 100 мкл среды, содержащей вирусные частицы FUW-M2rtTA ($2,5 \times 10^6$ Ед./мл). Через 6-8 ч к клеткам добавляли 800 мкл свежей среды для культивирования МЭФ. Начиная со следующего дня, клетки растили на среде для культивирования мышинных ИПСК с добавлением доксициклина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) в концентрации 5 мкг/мл. Среду меняли на свежую каждый день. 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 клонов ИПСК их отбирали и культивировали далее в соответствующей среде без добавления доксициклина.

Получение тератом и анализ гистологических срезов

Мышинные ИПСК снимали с культуральных чашек с помощью трипсина, промывали фосфатным буфером (PBS) и вводили подкожно в заднюю ногу мышам линии NUDE (The Jackson Laboratory, Бар Харбор, США) по 10^6 клеток, разведённых в буфере PBS. Через 3-4 недели мышей забивали, вырезали тератомы и фиксировали их ночь при температуре +4°C в 4% растворе параформальдегида, разведённого в буфере PBS. От фиксированных тератом отрезали фрагменты, примерно, 5 мм в диаметре и проводили их дегидратацию в растворах этилового спирта, повышающейся концентрации 70 – 80 – 96%, затем в изобутаноле и, наконец, дважды в ксилоле (1 ч при комнатной температуре в каждом растворе). Дегидратированные фрагменты ткани инкубировали один раз в растворе 50% парафин + 50% ксилол, затем дважды в 100% парафине (каждый из этапов проводился в течение 1 ч при температуре +56°C. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм

изготавливали на микротоме Leica RM2235 (Leica Biosystems, Вецлар, Германия). Срезы сушили в течение ночи при температуре +37°C, затем дважды по 5 мин отмывали от парафина в ксилоле и регидратировали в серии растворов этилового спирта нисходящей концентрации: 96 – 80 – 70% по 5 мин в каждом и наконец в дистиллированной воде в течение 1 мин. Далее срезы окрашивали в гематоксилине в течение 5 мин, затем промывали 10 мин в проточной воде, окрашивали эозином в течение 5 мин и ещё раз промывали дистиллированной водой 1 мин. После дегидратации окрашенных срезов в серии растворов этилового спирта восходящей концентрации: 70 – 80 – 96 по 3 мин в каждом, а также дважды в по 5 мин в ксилоле, их заключали в канадский бальзам и накрывали покровными стёклами. Препараты высушивали при температуре +37°C в течение ночи. Срезы анализировали под микроскопом EVOS Cell Imaging Systems Substrate (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Перенос ИХЧ из клеток линии СНО в ИПСК мыши

Перенос ИХЧ осуществляли в ИПСК мыши с помощью метода ретроММСТ (Microcell-Mediated Chromosome Transfer) [22] с небольшими модификациями [23]. Клетки линии СНО, содержащие терапевтическую альфоидную^{TetO}-ИХЧ, трансдуцировали лентивирусами, несущими кассету EnvΔR-IRES-TdTomato (MOI = 4, титр вируса – 6×10^6 Ед./мл). Далее эти клетки выращивали в 12 флаконах T-25 (Greiner, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), предварительно покрытых раствором коллагена I (50 мкг/мл) (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) на среде для культивирования клеток линии СНО. После того как клетки покрывали 80-100% поверхности флаконов в среду добавляли цитостатики TN-16 (итоговая концентрация 160 нМ) (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) и гризеофульвин (итоговая концентрация 50 нМ) (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) и продолжали культивировать в таких условиях в течение 3 дней, ежедневно меняя среду на свежую. Утром четвёртого дня среду меняли на среду DMEM (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США), содержащую латранкулин Б (2 мкМ раствор) (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США), полностью заполняя средой стерильную 50 мл пробирку. Далее флаконы помещали в стаканы для центрифугирования и прикрепляли с помощью клейкой ленты. Стаканы наполняли 130 мл согретой до +37°C дистиллированной водой, уравнивали и центрифугировали при скорости 8000 об./мин и температуре +34°C в течение 1 ч в центрифуге Avanti HP-26XP, используя ротор JLA-10.500 (Beckman Coulter Life Sciences, Индианаполис, США). После центрифугирования сливали супернатант, а осадок разводили в среде DMEM и

фильтровали последовательно через фильтры Whatman™ Nuclepore (GE Healthcare, Чикаго, США) с уменьшающимся диаметром пор: 8, 5 и 3 мкм. Фракцию микроклеток замораживали в специальной среде - Cellbanker freezing media (Zenoaq, Токио, Япония) при температуре -80°C [24]. ИПСК выращивали в 6 см чашках до 80% плотности покрытия. Клетки снимали с чашек с помощью трипсина, осаждали и ресуспендировали в 250 мкл тёплой среды для культивирования ИПСК мыши. Одновременно размораживали ¼ часть приготовленных микроклеток, промывали их в 10 мл холодной среды DMEM, осаждали и ресуспендировали в 50 мкл тёплой среды для культивирования ИПСК мыши. Полученные аликвоты ИПСК мыши и микроклеток соединяли, аккуратно перемешивали, инкубировали в течение 10 мин при температуре +37°C, затем осаждали, ресуспендировали в 6 мл среды для культивирования ИПСК мыши и переносили на покрытые желатином 6 см чашки Петри. Через 24 ч среду меняли на свежую, содержащую бластицидин S в концентрации 3 мкг/мл до появления GFP-позитивных клеточных клонов, которые отбирали и наращивали для дальнейшей работы.

Отбор ИПСК мыши с помощью проточной цитофлуорометрии

ИПСК 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 ИПСК мыши, с добавлением фунгизона (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Иммуноцитохимия

Клетки выращивали в 48-луночном планшете до 80-100% плотности покрытия, промывали фосфатным буфером (PBS) и фиксировали 4% раствором параформальдегида, разведённого в буфере PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали буфером PBS с 0,1% Triton X-100 (AppliChem, Гамбург, Германия), разведённого в буфере PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали в 3% растворе бычьего сывороточного альбумина (VWR Chemicals, Солон, США), разведённого в буфере PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами: мышинными антителами против Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, США) (разведение 1:500), кроличьими антителами

против Nanog (Bethyl Laboratories, Монтомери, США) (разведение 1:1000), разведёнными в буфере PBS, содержащем 0,1% детергента Tween20 и 3% бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию проводили в течение ночи при температуре +4°C. На следующий день, после промывки клеток трижды буфером PBS с 0,1% Tween20, клетки инкубировали с вторичными антителами: против антител мыши, конъюгированными с флуоресцентным агентом Alexa647 и против антител кролика, конъюгированных с флуоресцентным агентом Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, США). Вторичные антитела разводили в растворе того же состава, что и первичные, в соотношении 1:1000, инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки промывали три раза буфером PBS с 0,1% Tween20 и докрашивали с помощью DAPI, разведённом в буфере PBS в соотношении 1:5000 в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее раствор заменяли на буфер PBS, содержащий азид натрия и анализировали окрашенные клетки с помощью микроскопа EVOS Cell Imaging Systems (Thermo Fischer Scientific, Уолтем, США).

Анализ митотической стабильности FVIII-альфаидной^{TetO}-ИХЧ в ИПСК

ИПСК, содержащие терапевтическую ИХЧ культивировали в присутствии в среде бластицидина в концентрации - 4 мкг/мл в течение 20 дней. Затем клетки растили без бластицидина ещё 15 дней. После отбора клеток на бластицидине и через 15 дней после его удаления из среды, с помощью проточного цитофлуориметра определяли долю EGFP-позитивных клеток, 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 производили по формуле, применяемой для данной цели [25,26]: $N_{15} = N_0 \times (1 - R)^{15}$, где N_{15} – это процент метафазных пластинок, содержащих ИХЧ или процент EGFP-позитивных клеток после культивирования клеток в течение 15 дней в отсутствие бластицидина, N_0 – это процент метафазных пластинок или EGFP-позитивных клеток после 20 дней содержания клеток в среде с бластицидином и R – это индекс потери ИХЧ за день.

Субклонирование мышинных ИПСК

Субклонирование проводилось с целью отбора ИПСК клонов, обладающих высокой митотической стабильностью, стабильным кариотипом, высокой экспрессией трансгена. Мышиные ИПСК культивировали на 6-луночном планшете в среде для мышинных эмбриональных стволовых клеток до 80-90% покрытия, затем рассеивали на 10-

сантиметровую чашку Петри в количестве 1 000 клеток на чашку. После нескольких дней инкубации клетки формировали хорошо различимые глазом колонии. При помощи флуоресцентного микроскопа EVOS-FL-Auto отбирали единичные колонии, экспрессирующие EGFP (светящиеся зеленым). Собирали данные колонии и после трипсинизации культивировали в лунках 96-луночного планшета. Каждые 1-3 дня при помощи флуоресцентного микроскопа EVOS-FL-Auto проводили оценку экспрессии EGFP в клетках. Те клоны, в которых поддерживалось свечение EGFP пересевали и наращивали в лунках большего диаметра для дальнейшего получения метафазных пластинок и FISH анализа для оценки стабильности ИХЧ. Клоны, в которых искусственная хромосома оказывалась наиболее стабильной использовали в дальнейшей работе.

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. Эксперименты на мышцах проводились в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, подтверждёнными сертификатом OLAWNIH (идентификационный номер – F18-00380, Институт цитологии РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборка векторов для доставки терапевтического гена в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ

С помощью методов молекулярного клонирования нами были получены генетические вектора для доставки гена FVIII в альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ (конструкции CMV-tDNA-optFVIII и EF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII) (Рис. 1). Элементы, общие для обеих конструкций – это: ориджин репликации, необходимый 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^{Tet^O}-ИХЧ; 3' фрагмент гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (HPRT), который после встраивания векторов в альфоидную^{Tet^O}-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 NAT среде [27]; ген зелёного флуоресцентного белка GFP под контролем повсеместного промотора CAG [28], как дополнительный маркер селекции клеток; кДНК гена фактора свёртывания крови VIII; кластеры тДНК в качестве инсуляторов [29–31], которые фланкируют гены GFP и FVIII, для предотвращения ингибирующего влияния на транскрипцию трансгенов со стороны центрохроматина, после встраивания векторных конструкций в альфоидную^{Tet^O}-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.

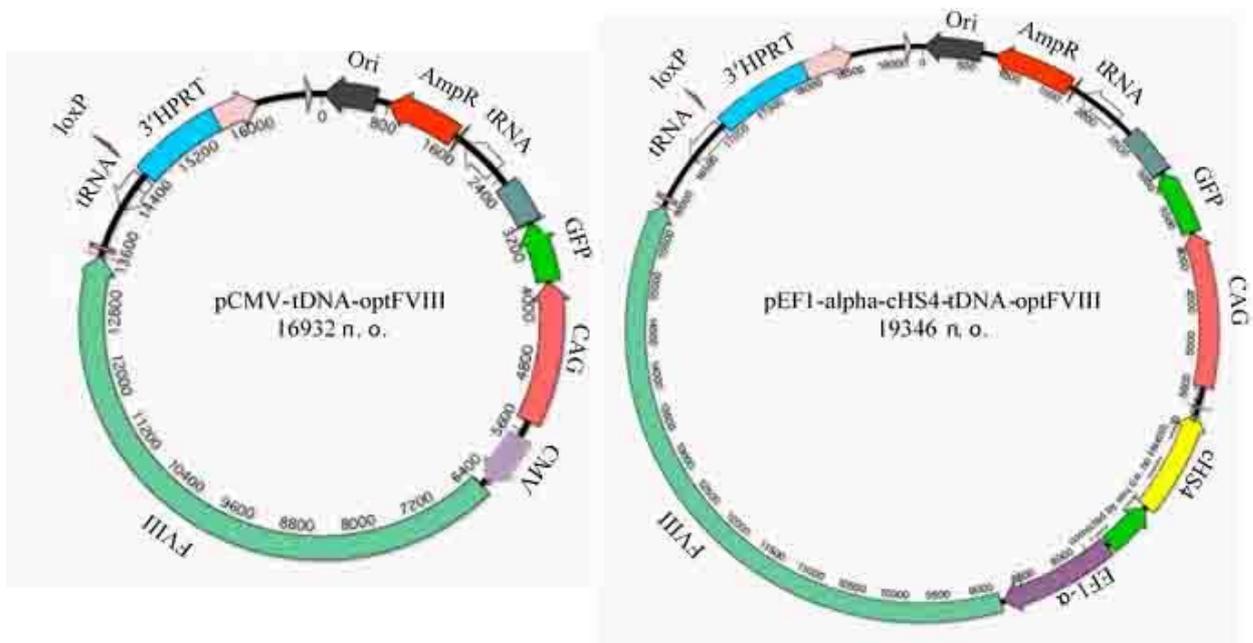


Рисунок 1 – Векторные конструкции для встраивания трансгенов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ

Обозначения: *Ori* – ориджин репликации (чёрная стрелка), *AmpR* – ген устойчивости к ампициллину (короткая красная стрелка), *tRNA* – кластер генов тРНК (прозрачная стрелка), *GFP* – ген зелёного флуоресцентного белка (короткая зелёная стрелка), *CAG* – промотор, контролирующий транскрипцию гена *GFP* (длинная красная стрелка), *chis4* – инсулятор жёлтая стрелка, *CMV* и *EF1-α* – промоторы, контролирующие транскрипцию гена *FVIII* (фиолетовые стрелки), *FVIII* – кДНК гена фактора свёртывания крови VIII (длинная зелёная стрелка), *loxP* – сайт для *Cre/lox* – рекомбинации.

Встраивание трансгенов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ с помощью *cre/lox*-рекомбинации

Генетические векторные конструкции pCMV-tDNA-optFVIII и EF1-alpha-chS4-tDNA-optFVIII были встроены в альфоидную^{TetO}-ИХЧ, находящуюся в HPRT^{-/-} клетках линии CHO, с помощью сайт-специфичной Cre/lox-рекомбинации. Для этого HPRT^{-/-} клетки линии CHO, несущие альфоидную^{TetO}-ИХЧ, были трансфицированы с помощью липофекции вектором pMC-Cre, содержащим ген Cre-рекомбиназы, а также конструкциями pCMV-tDNA-optFVIII или EF1-alpha-chS4-tDNA-optFVIII. При встраивании трансгена в альфоидную^{TetO}-ИХЧ в правильной ориентации, происходит соединение 3'-фрагмента гена HPRT, находящегося в векторной конструкции с 5'-фрагментом, находящимся в альфоидной^{TetO}-ИХЧ (Рис. 2). После этого в клетках

происходит восстановление функции гена HPRT, что позволяет производить отбор клеточных клонов с корректной вставкой трансгена.

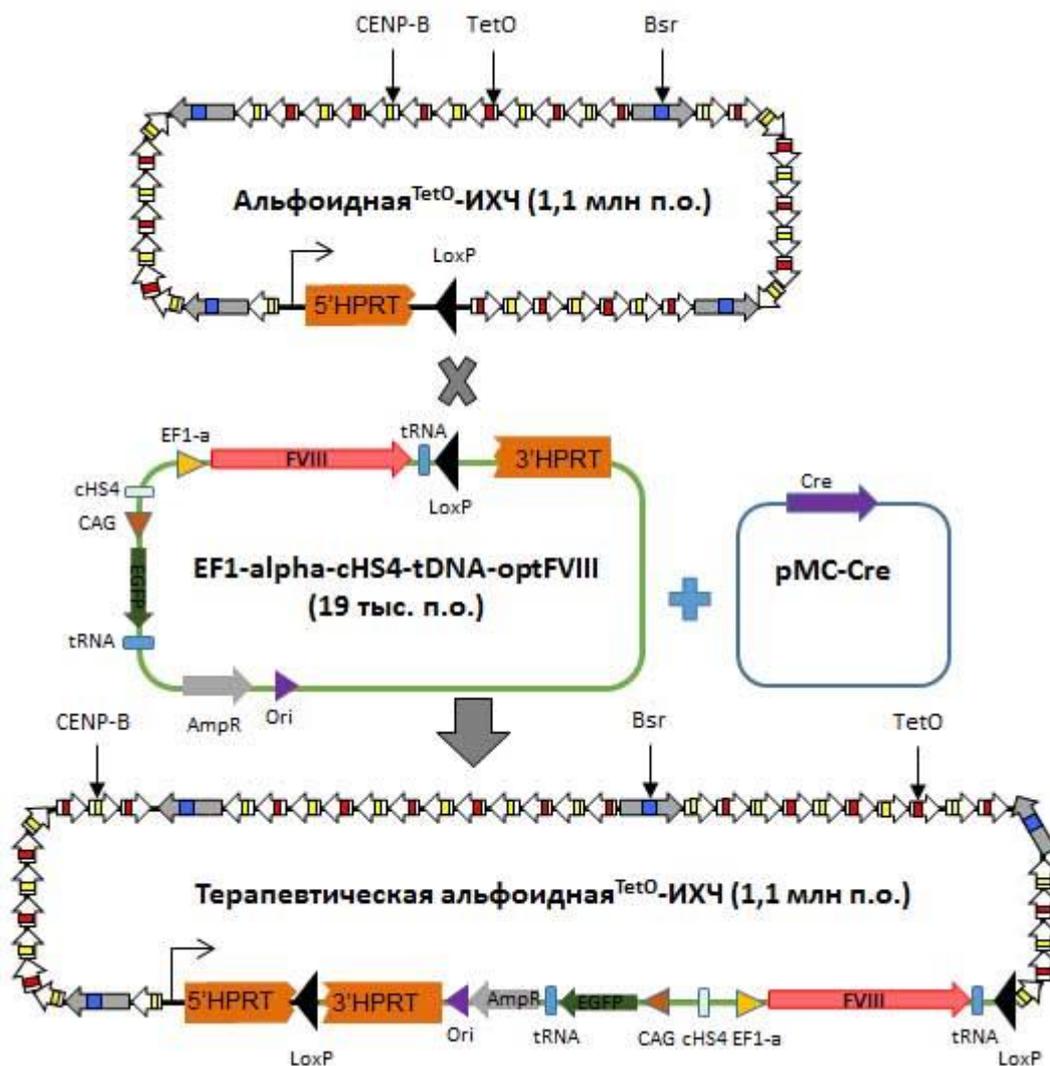


Рисунок 2 – Схема встраивания трансгенов в альфоидную^{TetO}-ИХЧ

После корректного встраивания вектора с трансгенами в альфоидную^{TetO}-ИХЧ с помощью Cre/loxP-рекомбинации, происходит восстановление функционального гена HPRT, что позволяет производить отбор клеток на селективной HAT-среде. 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 бластицидину, 5'HPRT и 3'HPRT – 5' и 3'-фрагменты гена HPRT, сайт LoxP обозначен чёрными треугольниками, tRNA – кластеры генов тРНК, выполняющие функцию инсуляторов обозначен синими прямоугольниками, инсулятор cHS4 обозначен светло-зелёным прямоугольником, кДНК гена FVIII изображена в виде красной стрелки, промотор EF1-α отмечен в виде жёлтого треугольника, промотор

CAG обозначен коричневым треугольником, ген *GFP* обозначен зелёной стрелкой, ген устойчивости к ампициллину (*AmpR*) изображён в виде серой стрелки, ориджин репликации (*Ori*) обозначен фиолетовым треугольником, ген *Cre*-рекомбиназы отмечен в виде фиолетовой стрелки.

После *Cre/Lox* – рекомбинации генетического вектора *pEF1-alpha-cHS4-tDNA-ortFVIII* и альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ, на селективной НАТ-среде нами было отобрано 15 клонов клеток линии СНО, 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 иммуноблоттинг 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^{Tet^O}-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^{Tet^O}-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^{Tet^O}-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.

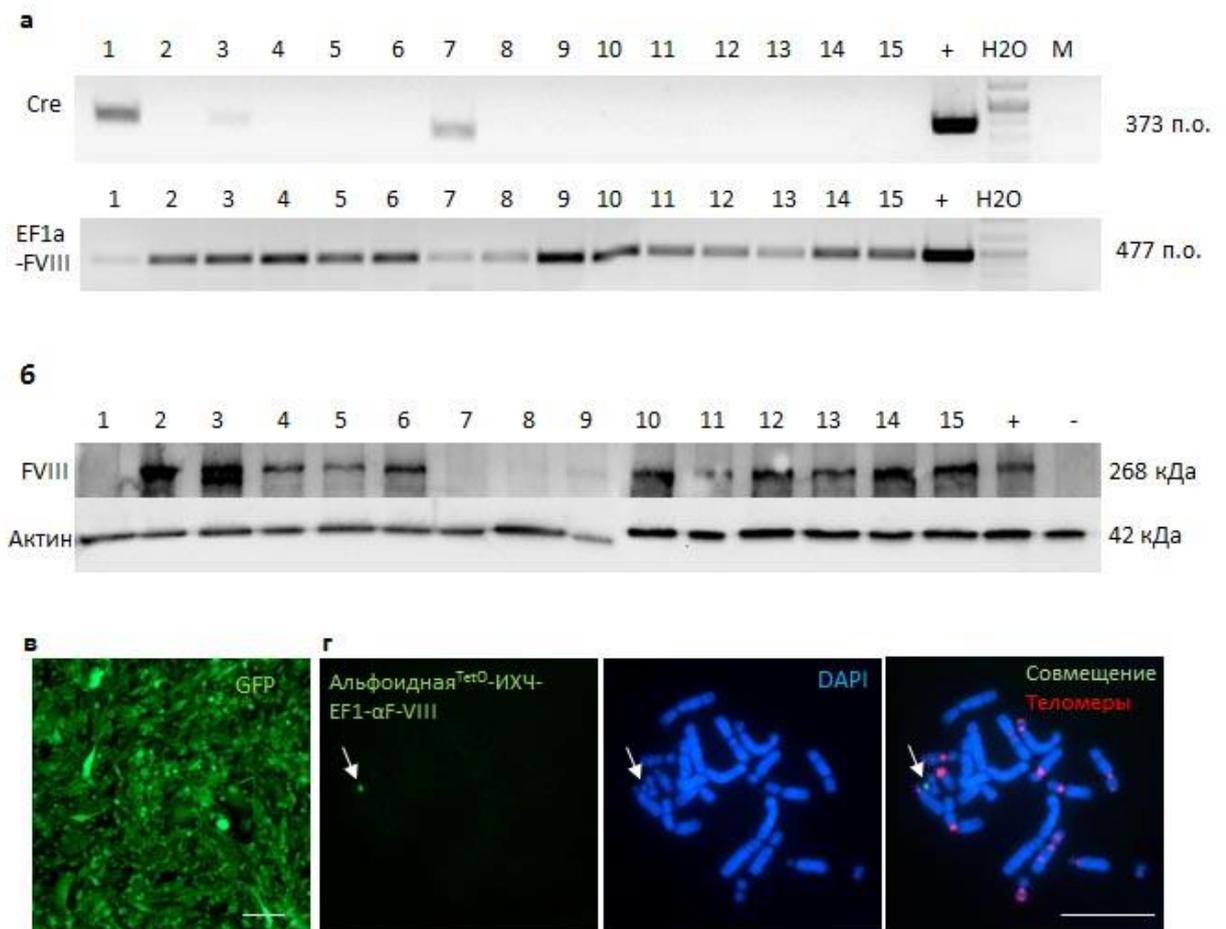


Рисунок 3 – Клетки линии CHO с, терапевтической альфоидной^{TetO}-ИХЧ с геном FVIII под контролем промотора EF1-α

а) ПЦР анализ клонов клеток линии CHO отобранных на селективной НАТ-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, видно спонтанное встраивание в трёх клеточных клонках. Клеточные клоны обозначены цифрами. В качестве позитивного контроля (+) использована плаزمида pMC-Cre. На нижней фотографии геля – амплификация фрагмента трансгена EF1-α-FVIII, видно его наличие у всех клеточных клонов. В качестве позитивного контроля (+) использована плазмида pEF1-alpha-cHS4-tDNA-optFVIII.

б) Иммуноблоттинг анализ на наличие экспрессии гена FVIII в клетках CHO-ИХЧ-EF1-α-FVIII. Экспрессия гена FVIII отмечена у 12 из 15 клонов. 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 локализируются 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 (Рис. 4).

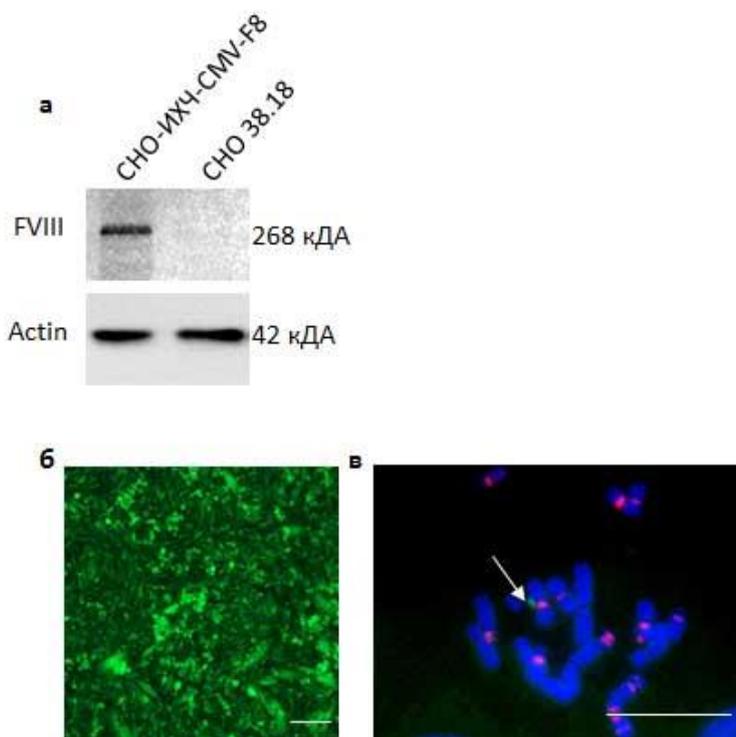


Рисунок 4 – Отобранный клон клеток линии CHO, несущий терапевтическую альфоидную^{TetO}-ИХЧ с геном FVIII под контролем промотора CMV

а) Иммуноблоттинг анализ экспрессии гена FVIII. В качестве отрицательного контроля (-) использовали лизаты клеток исходной линии CHO 38.18, содержащих «пустую» альфоидную^{TetO}-ИХЧ.

б) Флуоресценция GFP клеток CHO-ИХЧ-CMV-FVIII после отбора на селективной NAT-среде. Масштабная линейка – 100 мкм.

в) FISH анализ препарата метафазных пластинок отобранного клеточного клона

СНО-ИХЧ-СМV-FVIII. Зелёный сигнал – зонд к альфасателлитной последовательности альфаоидной^{TetO}-ИХЧ, красный сигнал – зонд к теломерным последовательностям (у клеток линии СНО данные последовательности локализируются вблизи центромерных участков). Масштабная линейка – 10 мкм.

Получение ИПСК из фибробластов мышей нокаутной по гену FVIII линии

Для получения ИПСК использовали фибробласты, полученные из кончика хвоста мутантных мышей линии, нокаутной по гену FVIII [32]. После выведения таких фибробластов в культуру их трансдуцировали лентивирусными доксициклин-зависимыми полицистронными конструкциями, содержащими гены Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc (OSKM), а также rtTA-активатор [21]. Через 16-20 дней после лентивирусной трансдукции были отобраны 8-10 клонов ИПСК. 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 мышцах линии NUDE с тканями всех трёх зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) (Рис. 5). Таким образом нами было отобрано 2 клона ИПСК, нокаутных по гену FVIII.

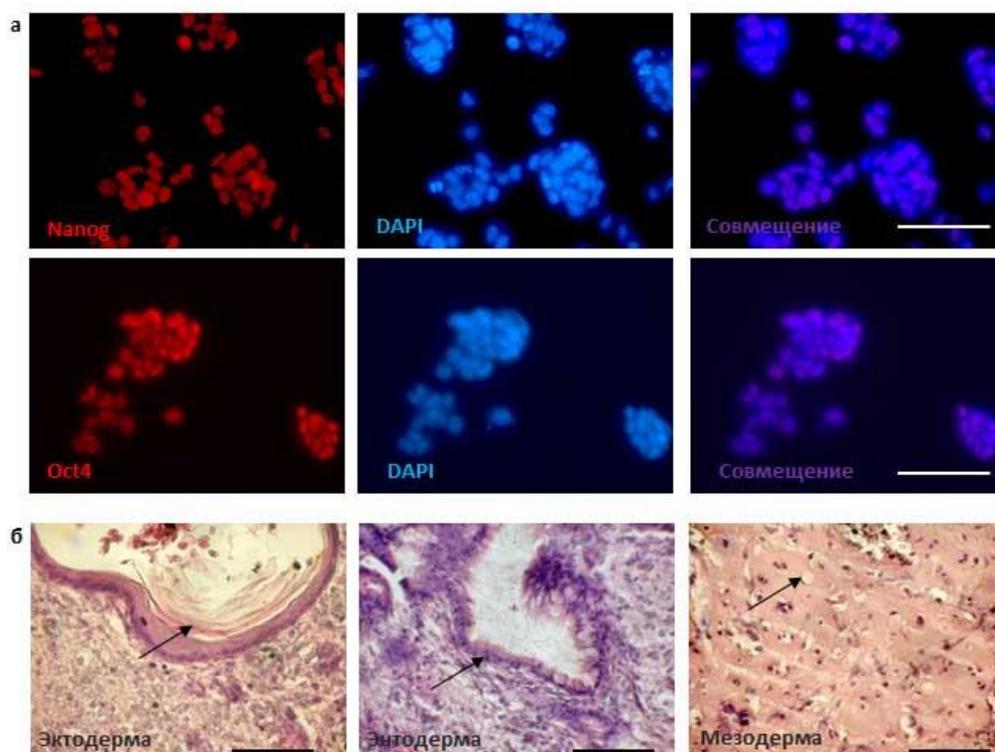


Рисунок 5 – Экспрессия генов маркеров плюрипотентности и формирование тератом ИПСК (FVIII^{-/-}-ИПСК), полученных из фибробластов мышей нокаутных по гену FVIII

а) Иммуноцитохимическое окрашивание FVIII^{-/-}-ИПСК 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^{-/-}-ИПСК в бестимусных мышцах линии NUDE. Стрелками обозначены: кератиновый эпидермис (эктодерма), бокаловидные клетки кишечного эпителия (энтодерма), хрящевые клетки (мезодерма).

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

Для переноса терапевтической альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ из клеток линии СНО в FVIII^{-/-}-ИПСК мыши (клон №2) мы использовали метод ретро-ММСТ [22] с модификациями, используемыми в нашей лаборатории [14], а также метод ММСТ [23]. Подготовленные микроклетки перед слиянием с клетками-реципиентами хранились в замороженном при температуре -80°C виде. После переноса альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ в мышинные FVIII^{-/-}-ИПСК, их выращивали в течение недели на среде с бластицидином, в концентрации 2 мкг/мл. После появления клеточных клонов, выживающих в присутствии антибиотика, бластицидин убирала 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^{-/-}-ИПСК с помощью методов ММСТ [23] 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, Иммуноблоттинг анализ не выявил в них экспрессии гена FVIII, несмотря на наличие экспрессии гена GFP, находящегося в этой же ИХЧ (Рис. 8). Таким образом, дальнейшая работа была сосредоточена на мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК с альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ.

Характеристика мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ

Всего было отобрано 8 клонов мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащих

альфойдную^{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. 6, 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. 6, б). Были получены препараты метафазных пластинок данных клеток и с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было показано, что альфойдная^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ присутствует в этих клетках в автономной форме (Рис. 6, в).

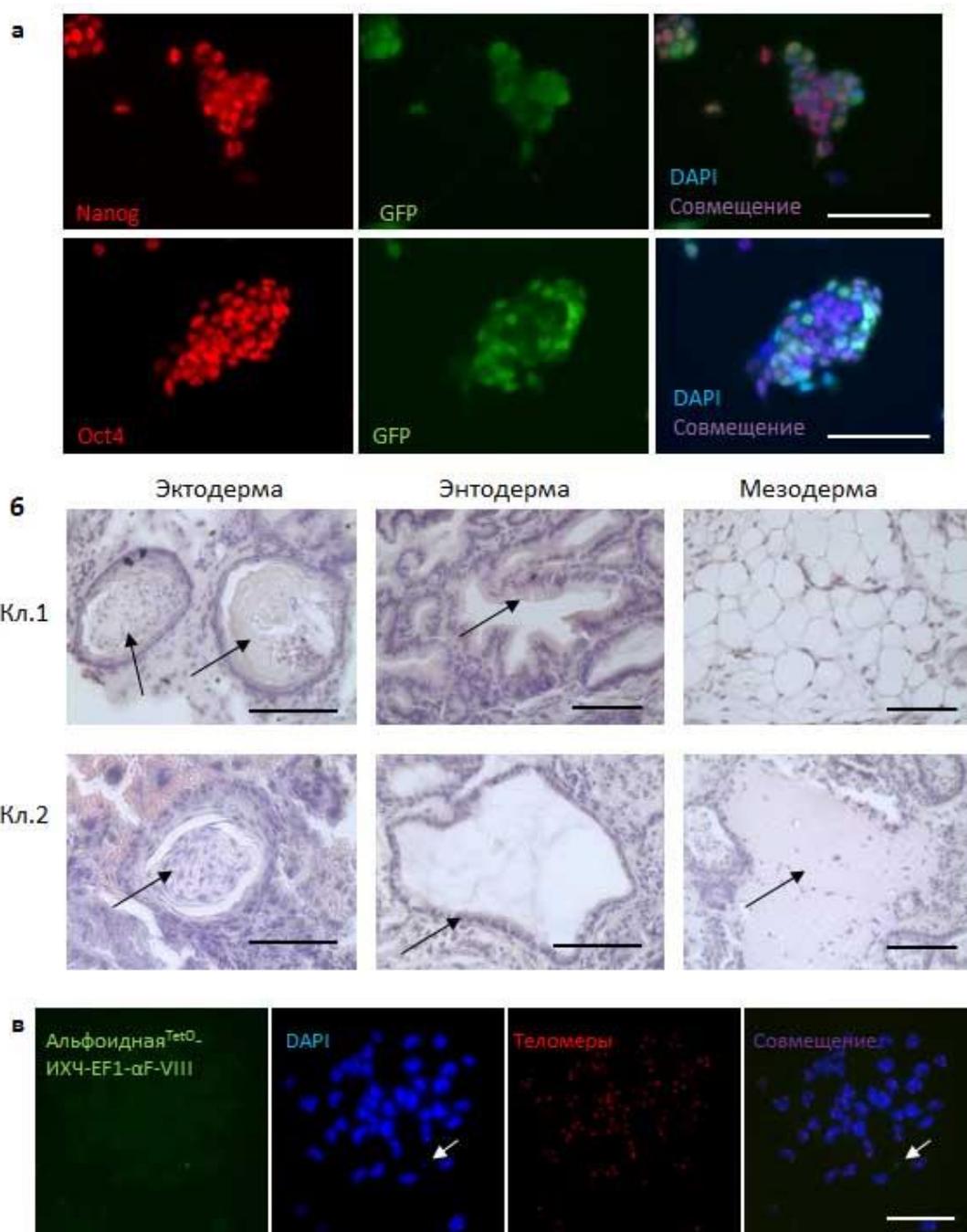


Рисунок 6 – Характеристика мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащих альфойдную^{TetO}-EF1-α-FVIII-ИХЧ

а) Иммуноцитохимическое окрашивание мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащих альфойдную^{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^{-/-}-ИПСК, содержащих альфойдную^{TetO}-EF1-α-FVIII-ИХЧ клеток (клоны №1 и 2) в бестимульных 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 $FVIII^{-/-}$ -ИПСК, 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 $FVIII^{-/-}$ -ИПСК, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ, клетки выращивали до 5 и 10 пассажа, затем анализировали клеточные лизаты методом Иммуноблоттинг. Поскольку клетки выращивали на среде без бластицидина, в культуре происходило постепенное накопление клеток, теряющих ИХЧ, поэтому перед приготовлением лизата, отбирали только клетки, позитивные по флуоресцентному зелёному GFP сигналу с помощью клеточного сортирования на проточном цитофлуориметре. С помощью Иммуноблоттинг 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. 7). Также стоит отметить, что экспрессия гена FVIII в клетках СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клон №2) оказалась в несколько раз выше, чем в $FVIII^{-/-}$ -ИПСК мыши (обе содержали одну копию альфоидной^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ (Рис. 7).

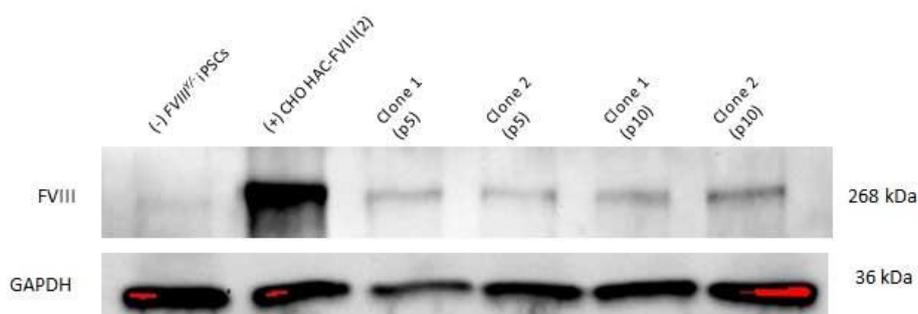


Рисунок 7 – Иммуноблоттинг анализ экспрессии гена FVIII в $FVIII^{-/-}$ -ИПСК мыши, содержащих альфоидную^{TetO}-EF1- α -FVIII-ИХЧ (клоны №1 и 2) на 5 (p5) и 6 (p6) пассажах

В качестве негативного контроля использовался лизат, полученный из исходных мышинных $FVIII^{-/-}$ ИПСК. Позитивный контроль - клетки СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клон №2). Для контроля нагрузки общего белка, мембрану окрашивали также с помощью

антител против белка глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

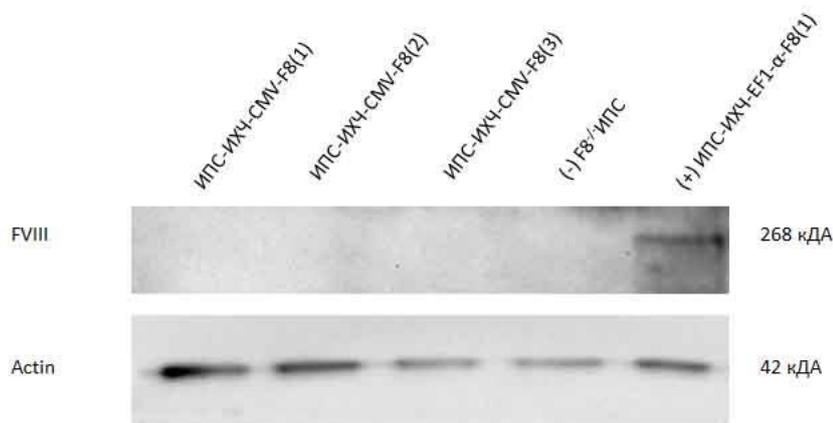


Рисунок 8 – Иммуноблоттинг анализ экспрессии гена FVIII мышинными FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащими альфоидную^{Tet^O}-СМV-FVIII-ИХЧ

В качестве негативного контроля использовался лизат, полученный из исходных мышинных FVIII^{-/-} ИПСК. Позитивный контроль - клетки ИПСК-ИХЧ-EF1-α-FVIII (клон №1).

Мышинные FVIII^{-/-}-ИПСК, содержащие альфоидную^{Tet^O}-EF1-α-FVIII-ИХЧ

Ранее с помощью метода ММСТ было получено 8 клонов мышинных FVIII^{-/-}-ИПСК клеток, содержащих альфоидную^{Tet^O}-EF1-α-FVIII-ИХЧ, позитивных по флуоресцентному зелёному GFP сигналу (отчет 2020г). Мы установили, что клетки только 2 клонов, которые были получены с помощью метода ретроММСТ, способны экспрессировать ген фактора свёртывания крови VIII (клоны №1 и 2). На основе анализа метафазных пластинок с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было показано, что альфоидная^{Tet^O}-EF1-α-FVIII-ИХЧ присутствует в этих клетках в автономной форме. Ранее проведенный анализ также показал, что данные ИПСК остаются полностью плюрипотентными, экспрессируют Nanog и Oct4 и образуют полноценные тератомы в иммунодефицитных мышах.

Анализ функциональной активности белка FVIII, экспрессирующегося с ИХЧ

Также нами был проведён функциональный тест для определения активности белка FVIII в культуральной среде при содержании клеток в условиях *in vitro* и в плазме крови мышей при подкожных трансплантациях полученных нами клеточных клонов, содержащих ИХЧ-EF1-α-FVIII. Для измерения активности белка FVIII в культуральной

среде, на чашки одновременно высевали одинаковое количество клеток СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII, СНО-ИХЧ-CMV-FVIII, ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (кл. №1), ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (кл. №2), а также исходные клоны СНО 38.18 и FVIII^{-/-} ИПСК в качестве отрицательного контроля. Через двое суток отбирали образцы культуральной среды и с помощью специального фирменного набора Chromogenix Coamatic Factor VIII (Diapharma, Уэст Честер, США) измеряли активность белка FVIII, используя спектрофотометр. С помощью данного подхода нам удалось зарегистрировать активность белка FVIII в культуральной среде из чашек с клетками СНО-ИХЧ-EF1- α -VIII, однако показатели других образцов не превышали показателей отрицательных контролей (данные не представлены). Эти данные могут указывать, что данный трансген, являющийся секретируемым растворимым белком, не секретируется плюрипотентными стволовыми клетками в связи с отсутствием у них данной функции или разрушается как чужеродный белок. Дальнейшие исследования будут направлены на исследование секреции FVIII в дифференцированных клетках, полученных из данных ИПСК.

Анализ митотической стабильности FVIII-альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ИПСК

Митотическая стабильность ИХЧ является одним из важных характеристик, требуемых для использования в качестве генотерапевтических векторов, и представляет собой частоту потери хромосомных единиц ИХЧ в процессе клеточного деления. В связи с этим мы провели оценку показателя потери альфоидной^{TetO}-ИХЧ за день в клетках ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клоны 1 и 2), ИПСК-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), полученных ранее в нашей лаборатории [33] (Рис. 3). Для оценки данного показателя использовался стандартный протокол [34][35]. Клетки выращивали в течение 20 суток на среде с добавлением бластицидина (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 бластицидина. Через 15 дней ещё раз отбирали клетки для их анализа теми же методами (Рис. 3). 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^{Tet^O}-ДНК и препаратов метафазных пластинок, определяли процент клеток, содержащих в геноме альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ (Табл. 2). Полученные показатели позволили рассчитать показатель суточной потери клетками альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ (Табл. 1 и 2).

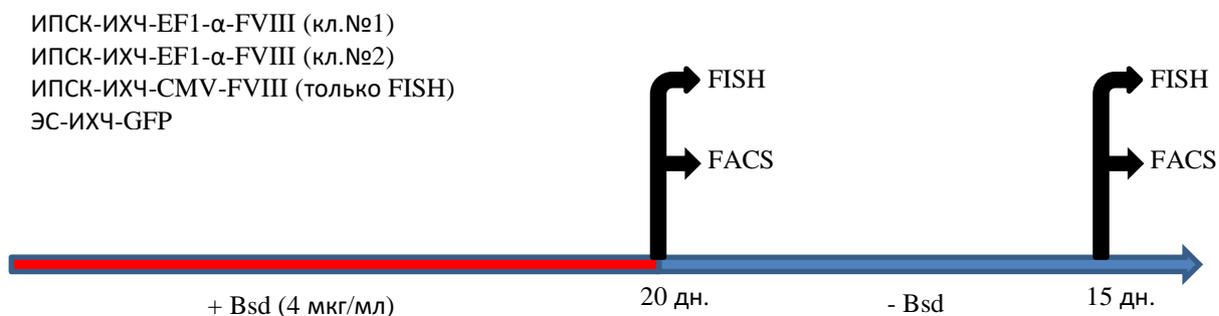


Рисунок 9 – Схема эксперимента по подсчёту показателя потери альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ в день

Клетки выращивали в течение 15 дней в присутствии бластицидина (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 бластицидина и ещё раз отбирали образцы для аналогичного анализа. Для эксперимента использовали клетки, перечисленные на рисунке.

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

FACS	ЭС-ИХЧ-GFP	ИПСК-ИХЧ-EF1-α-FVIII (Кл. №1)	ИПСК-ИХЧ-EF1-α-FVIII (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

Таблица 2 – Показатели стабильности альфойдной^{Tet^O}-ИХЧ в клетках, определённых с помощью FISH-анализа метафазных пластинок

FISH	ЭС-ИХЧ-GFP	ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (Кл. №1)	ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (Кл. №2)	ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII
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

Дополнительно, мы оценивали динамику накопления GFP-негативных клеток в клонах ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клоны № 1 и 2), культивируемых в среде без добавления бластицидина, таким образом косвенно анализируя динамику спонтанной потери клетками альфойдной^{Tet^O}-ИХЧ. Для этого, с помощью цитофлуориметра, мы отбирали только GFP-позитивные клетки и высевали их на чашки. В процессе культивирования с помощью проточной цитофлуориметрии оценивали количество GFP-позитивных клеток через 8, 18 и 22 дней после изначального посева на чашку (Рис. 4, а). По полученным данным был построен график (Рис. 4, б). На основании полученных Исходя из данных, видно, что в ходе культивирования клеток на среде, не содержащей селективного агента, в обоих рассматриваемых клонах происходит постепенная потеря экспрессии гена EGFP с искусственной хромосомы. Причинами являются (1) потеря ИХЧ в процессе деления клеток, (2) эпигенетическое «глушение» трансгена и (3) перестройки ИХЧ или встраивание ИХЧ в геном хозяина (хромосомные aberrации).

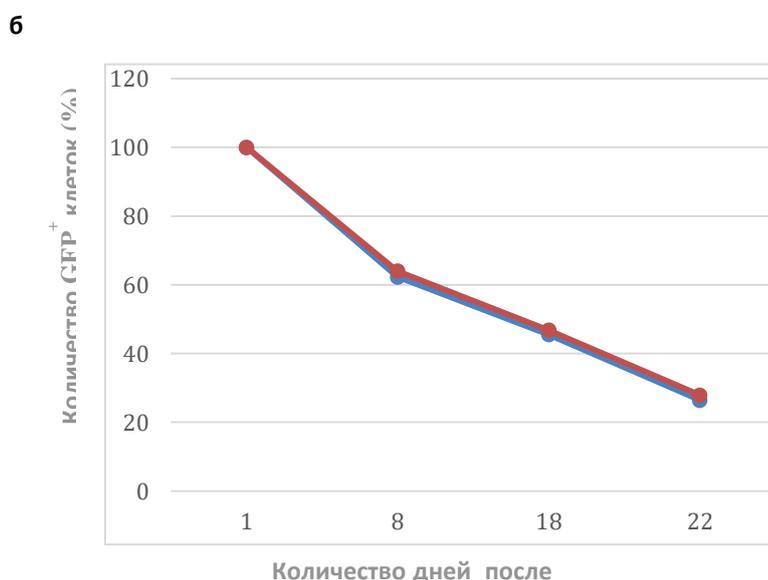
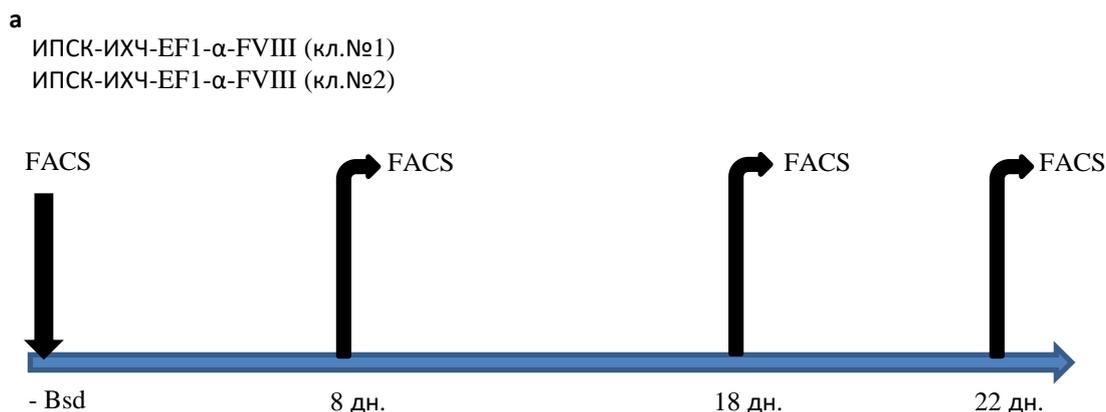


Рисунок 10 – Динамика потери альфойдной^{TetO}-ИХЧ клетками ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII (клоны № 1 и 2) в неселективных условиях

а) *Схема эксперимента: в начале эксперимента с помощью проточного цитофлуориметра отбирали только GFP-позитивные клетки, которые затем выращивали на среде без бластицидина. Через 8, 18 и 22 дня отбирали клеточный материал для оценки процента GFP-позитивных клеток в культуре с помощью проточной цитофлуориметрии.* **б)** *Графики, построенные на основании полученных в эксперименте данных. Оранжевая линия –клон ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII №1, синяя линия –клон ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII №2.*

Отбор линий ИПСК с повышенной стабильностью ИХЧ

Одним из подходов улучшения характеристик ИХЧ применимых для генотерапевтических целей является поиск наиболее стабильной ИХЧ или ИХЧ содержащего клона с помощью раундов субклонирования. С этой целью мы субклонировали два клона ИПСК-ИХЧ-EF1 α -FVIII-EGFP, содержащих промотор EF1 α , обеспечивающий достаточную экспрессию целевого трансгена. В процессе субклонирования из популяции клеток клона 1 линии ИПСК-НАС-EF1 α -FVIII-EGFP было отобрано 9 клонов с максимальной светимостью EGFP. Данный показатель мы рассматривали как индикатор наличия ИХЧ и отсутствия глушения трансгенов. Отметим, что клон E2 имел наиболее яркую флуоресценцию, а клоны A1, A9 и E1 к концу эксперимента имели наиболее слабое свечение.

Из популяции ИПСК клона 2 линии PS-НАС-EF1 α -FVIII-EGFP было отобрано 8 клонов с максимальной светимостью. Наибольшей светимостью обладал клон B6. Из каждого отобранного клона был получен препарат метафазных пластинок и проведена флуоресцентная *in situ* гибридизация для оценки качества искусственной хромосомы в полученных клонах. Результаты представлены в таблице 2.

Клетки субклонов A5 и A9 клона 1 ИПСК-ИХЧ-EF1 α -FVIII-EGFP содержали интактные ИХЧ и близкий к норме кариотип при этом у них не наблюдалась флуоресценция. Были отобраны клоны E2 и B6, обладающие стабильной экспрессией GFP и повышенной стабильностью ИХЧ (64% и 57% соответственно). Интересно отметить, что наблюдалась значительная вариация кариотипа между разными субклонами, что может указывать на геномную нестабильность ИПСК в культуре. Однако нельзя исключать ошибку данного метода анализа кариотипа. Таким образом, на основании вышеприведенных данных можно заключить, что ИХЧ-EF1 α -FVIII-EGFP не отвечает требованиям терапевтического вектора, а именно не обладает митотической и структурной стабильностью и устойчивой экспрессией трансгена.

Таблица 3 – **Название**

Клоны	Среднее количество хромосом хозяина на клетку	Доля метафаз с нормальной ИХЧ	Доля метафаз с абберациями ИХЧ
ИПСК-НАС-EF1α-FVIII-EGFP клон 1			
A1	36	34,5%	3,4%
A2	39	55,2%	13,8%
A5	41	53,3%	13,3%
A7	36	56,7%	23,3%
A8	39	23,3%	0,0%
A9	38	70,4%	7,4%
A11	39	10,0%	6,7%
E1	41	20,0%	5,0%
E2	39	64,5%	16,1%
ИПСК-НАС-EF1α-FVIII-EGFP клон 2			
B4	38	24,1%	10,3%
B5	50	20,0%	26,7%
B6	45	56,7%	3,3%
B7	38	51,6%	0,0%
B8	42	50,0%	10,0%
B10	41	30,0%	6,7%
B11	38	52,8%	5,9%
B12	40	48,4%	16,1%

*Жирным шрифтом выделены клоны с наибольшей экспрессией GFP (наибольшее свечение). Жирным шрифтом и курсивом выделены клоны с наибольшим процентом метафаз с ИХЧ.

ОБСУЖДЕНИЯ

Влияние альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ на плюрипотентные свойства мышинных ИПСК

В ходе данной работы из фибробластов нокаутных FVIII^{-/-} мышей были получены ИПСК. Плюрипотентные свойства полученных клеток были подтверждены с помощью иммуноцитохимического окрашивания на факторы плюрипотентности (Oct4 и Nanog), а также с помощью тератомного теста, при котором клетки дифференцировались в производные всех трёх зародышевых листков (эктодерма, мезодерма и энтодерма) (Рис. 5). После переноса в данные FVIII^{-/-} ИПСК терапевтической альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ, их плюрипотентный статус также был подтверждён (Рис. 6, а, б). Таким образом, разрабатываемый нами подход, по всей видимости может позволить в дальнейшем дифференцировать FVIII^{-/-} ИПСК с терапевтической альфоидной^{TetO}-FVIII-ИХЧ, содержащей гены GFP и FVIII в качестве трансгенов, в гепатоциты, эндотелиоциты или синусоидные клетки печени, т. е. в клетки тканей, вырабатывающих белок FVIII в организме [36].

Ранее было показано, что многие ИХЧ других типов также не влияют на плюрипотентный статус стволовых клеток [11,37–40], однако перенос альфоидной^{TetO}-ИХЧ в ЭС клетки мыши [33] и ИПСК мыши и человека [41] 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.

Особенности экспрессии трансгенов в полученных клетках

Для встраивания в альфоидную^{TetO}-ИХЧ гена FVIII, нами были получены 2 плазмидные конструкции. В каждой из которых гены GFP и FVIII находятся в положении «голова к голове» и ген GFP находится под контролем сильного повсеместного промотора CAG [28]. Различие плазмид друг от друга заключается в том, что в одной из них ген FVIII находится под контролем промотора CMV, а в другой - под контролем промотора EF1- α , и во второй конструкции между промоторами EF1- α и CAG присутствует инсулятор cHS4 [42] (Рис. 1). После того как была произведена Cre/lox рекомбинация данных векторных конструкций и альфоидной^{TetO}-ИХЧ (Рис. 2), находящейся в клетках CHO 38.18, были отобраны клеточные клоны CHO-ИХЧ-EF1- α -FVIII и CHO-ИХЧ-CMV-FVIII, содержащие

терапевтические альфоидные^{TetO}-ИХЧ с геном FVIII под контролем соответствующих промоторов. С помощью иммуноблоттинга 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 и 4, а). 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; 4, б).

Был произведён перенос терапевтических альфоидных^{TetO}-ИХЧ из клеток СНО-ИХЧ-EF1- α -FVIII и СНО-ИХЧ-CMV-FVIII в FVIII^{-/-}ИПСК мыши. В полученных клетках ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII, с помощью флуоресцентного микроскопа выявляется на высоком уровне зелёный сигнал белкового продукта GFP трансгена (Рис. 6, а), однако иммуноблоттинг анализ позволил выявить экспрессию трансгена FVIII только в клеточных клонах ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII, причём её уровень был существенно ниже, чем в клетках СНО, содержащих такую же генетическую конструкцию (Рис. 7). В клетках ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII белкового продукта гена FVIII обнаружить не удалось (Рис. 8).

Таким образом, мы наблюдаем разницу в уровне экспрессии трансгена FVIII в разных клетках (СНО и мышинных ИПСК), а также в одинаковых клетках, но содержащих разные трансгены (клетки ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII). Также нами отмечено, что экспрессия гена GFP имеет место как в ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII, так и в ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII, причём на достаточно высоком уровне.

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 «замолкать» в клетках благодаря эпигенетическому сайленсингу [20].

Другими группами также отмечалось, что уровень экспрессии трансгена, находящегося в составе ИХЧ может отличаться в зависимости от типа клеток, в которых находится векторная конструкция [43]. В ходе дальнейших экспериментов было бы интересно произвести перенос наших терапевтических альфоидных^{TetO}-ИХЧ в разные типы клеточных линий, а также дифференцировать ИПСК-ИХЧ-FVIII, в первую очередь в гепатоциты или синусоидные клетки печени, т. е. те, в которых происходит экспрессия гена FVIII в организме. Возможно, в новом эпигенетическом окружении будет наблюдаться более активная экспрессия трансгена.

Известно, что клетки линии СНО обладают высокой секреторной активностью, что

позволяет использовать данный клеточный тип в биотехнологии [44,45]. Возможно, именно этим можно объяснить разницу в экспрессии гена FVIII между клетками линии СНО и ИПСК мыши.

Поскольку в клетках ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII и ИПСК-ИХЧ-CMV-FVIII мы наблюдали высокий уровень экспрессии трансгена GFP и низкий уровень экспрессии трансгена FVIII (в клетках ИПСК-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. Действительно, когда промоторные области разных генов находятся вблизи друг друга, как в случае расположения трансгенов в наших векторных конструкциях – «голова к голове», они могут конкурировать между собой за транскрипцию, контролируемых ими генов. В таком случае более сильный промотор будет обеспечивать транскрипционную активность своего гена, подавляя при этом транскрипцию гена, контролируемого более слабым промотором. Нахождение инсулятора между промоторами, находящимися в положении «голова к голове» может снизить или устранить такую конкуренцию, разграничив их друг от друга [46]. 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 инсулятор cHS4, позволяют обеспечить экспрессию гена FVIII, правда и более слабую чем гена GFP.

Несмотря на то, что уровень экспрессии трансгена FVIII в клетках ИПСК-ИХЧ-EF1- α -FVIII является не очень высоким и уступает уровню экспрессии трансгена GFP, всё же он оказывается стабильным в клетках, содержащих альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ (Рис. 7).

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 [47]. 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 мегакариocyтах, в мышечные ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов мутантных FVIII^{-/-}-мышей. После дифференцирования

таких ИПСК, содержащих ИХЧ в мегакариоциты, в них была обнаружена экспрессия трансгена FVIII [48]. Таким образом данная научная группа добилась увеличения уровня экспрессии гена FVIII клетками, несущими терапевтическую ИХЧ, путём увеличения количества копий трансгена. В нашем случае использование одной копии FVIII трансгена регулируемого промотором EF1- α позволило экспрессировать данный трансген с альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Однако в связи с недостаточным и нестабильным уровнем экспрессии трансгена был сделан вывод, что необходимо значительное изменение конструкции, включая выбор более сильных регуляторных промоторов и возможно увеличение копий трансгена. В связи с вышеизложенным также остается под вопросом использование тканеспецифичных промоторов, которые имеют меньшую активность и могут легко эпигенетически блокироваться при внесении в данные ИХЧ. Однако наибольшим вопросом является структура альфоидной^{TetO}-ИХЧ. Именно, была замечена ее спонтанная полимеризация, а также встраивание в хромосомы клеток хозяина. Данные свойства ставят серьезные вопросы использования альфоидной^{TetO}-ИХЧ в тканезаместительной генотерапии. В связи с этим одной ИХЧ данного типа недостаточно для полноценных исследований и применения в качестве генотерапевтического вектора. Создание новых альфоидных кольцевых и линейных ИХЧ, не содержащих TetO последовательностей, критически необходимо для данной области исследования. Технология новосинтезированных искусственных хромосом человека имеет ряд серьезных проблемных участков, которые пока не находят эффективного решения. В первую очередь – это технология синтеза/получения ИХЧ и методы переноса ИХЧ в целевые клетки. Совершенствование и стандартизация данных процессов даст возможность более эффективному использованию данной технологии в создании генотерапевтических векторных систем для современной регенеративной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения проекта, поставленные задачи были выполнены. В результате были сделаны следующие выводы:

- 1) Впервые осуществлён перенос альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ в ИПСК мышцы.
- 2) С помощью альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ, содержащей ген фактора свёртывания крови VIII человека под контролем повсеместного промотора EF1- α , возможно обеспечить экспрессию данного гена в ИПСК мышцы.
- 3) Наличие в ИПСК мышцы альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ с трансгеном не нарушает их плюрипотентных свойств.
- 4) Определена митотическая стабильность альфоидной^{Tet^O}-ИХЧ-EF1 α -FVIII-CAG-GFP в ИПСК мышцы. Митотическая стабильность данной хромосомы является низкой, что не позволяет ее использование в генотерапевтических целях.
- 5) Проведено субклонирование клонов ИПСК, содержащих альфоидную^{Tet^O}-ИХЧ-EF1 α -FVIII-CAG-GFP с целью обнаружение наиболее митотически стабильных клонов. Выявлено, что митотическая стабильность субклонов не была значительно улучшена и сделан вывод, что данная конструкция ИХЧ не пригодна для использования в генотерапевтических целях.

Помимо прикладной значимости данных исследований полученные данные также важны для понимания функционирования и поддержания нососинтезированных искусственных хромосом человека в различных типах клеток млекопитающих, а также в фундаментальных вопросах организации центрального хроматина, стабильности и репликации хромосом. Получение новых вариантов альфоидных ИХЧ позволит более всесторонне исследовать их в генотерапевтических моделях, что возможно позволит их использование в биомедицинской практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F.L. Viral vectors: From virology to transgene expression // *Br J Pharmacol*. 2009. Vol. 157, № 2. P. 153–165.
2. Ghosh S. et al. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges // *Applied Biosafety*. 2020. Vol. 25, № 1. P. 7–18.
3. Hackett P.B., Largaespada D.A., Cooper L.J.N. A transposon and transposase system for human application // *Molecular Therapy*. The American Society of Gene & Cell Therapy, 2010. Vol. 18, № 4. P. 674–683.
4. Ivics Z., Izsvák Z. The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering // *Mob DNA*. 2010. Vol. 1, № 1. P. 1–15.
5. Skipper K.A. et al. DNA transposon-based gene vehicles - Scenes from an evolutionary drive // *J Biomed Sci*. 2013. Vol. 20, № 1. P. 1–23.
6. Murray Andrew W. Szostak Jack W. Construction of artificial genome in yeast // *Nature*. 1983. Vol. 305.
7. O'Connor M., Peifer M., Bender W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli* // *Science* (1979). Elsevier, 1989. Vol. 244, № 4910. P. 1307–1312.
8. Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. Vol. 87, № 1. P. 103–107.
9. Oshimura M. et al. New Vectors for Gene Delivery: Human and Mouse Artificial Chromosomes // *eLS*. 2013. P. 1–12.
10. Kouprina N., Larionov V. Recent advances in chromosome engineering // *Chromosome Research*. 2015. Vol. 23, № 1. P. 1–5.
11. Katona R.L. De novo formed satellite DNA-based mammalian artificial chromosomes and their possible applications // *Chromosome Research*. 2015. Vol. 23, № 1. P. 143–157.
12. Ikeno M., Hasegawa Y. Applications of bottom-up human artificial chromosomes in cell research and cell engineering // *Exp Cell Res*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 390, № 1. P. 111793.
13. Moralli D., Monaco Z.L. Gene expressing human artificial chromosome vectors: Advantages and challenges for gene therapy // *Exp Cell Res*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 390, № 1. P. 111931.
14. Sinenko S.A., Ponomartsev S. V., Tomilin A.N. Human artificial chromosomes for pluripotent stem cell-based tissue replacement therapy // *Exp Cell Res*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 389, № 1. P. 111882.
15. Kazuki Y., Oshimura M. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models // *Mol Ther*. 2011/07/14. 2011. Vol. 19, № 9. P. 1591–1601.
16. Koi M. et al. Construction of mouse A9 clones containing a single human chromosome tagged with neomycin-resistance gene via microcell fusion // *Jpn J Cancer Res*. 1989. Vol. 80, № 5. P. 413–418.
17. Ikeno M., Hasegawa Y. Applications of bottom-up human artificial chromosomes in cell research and cell engineering // *Exp Cell Res*. 2019/12/25. 2020. Vol. 390, № 1. P. 111793.
18. Kouprina N., Larionov V. Recent advances in chromosome engineering // *Chromosome Res*. 2015/02/16. 2015. Vol. 23, № 1. P. 1–5.
19. Iida Y. et al. Human artificial chromosome with a conditional centromere for gene delivery and gene expression // *DNA Research*. 2010. Vol. 17, № 5. P. 293–301.
20. Kononenko A. V. et al. Re-engineering an alphoidtetO-HAC-based vector to enable high-

- throughput analyses of gene function // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 10. P. 1–15.
21. Carey B.W. et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. Vol. 106, № 1. P. 157–162.
 22. Suzuki T. et al. 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.* 2016. Vol. 11, № 6. P. 1–11.
 23. Liskovyykh M. et al. Moving toward a higher efficiency of microcell-mediated chromosome transfer // *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016. Vol. 3, № December 2015. P. 16043.
 24. Uno N. et al. The transfer of human artificial chromosomes via cryopreserved microcells // *Cytotechnology.* 2013. Vol. 65, № 5. P. 803–809.
 25. Pesenti E. et al. Generation of a Synthetic Human Chromosome with Two Centromeric Domains for Advanced Epigenetic Engineering Studies: research-article // *ACS Synth Biol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 7, № 4. P. 1116–1130.
 26. Ikeno M. et al. Construction of YAC–based mammalian artificial chromosomes // *Nat Biotechnol.* 1998. Vol. 16, № 5. P. 431–439.
 27. Holliday R., Ho T. Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. Vol. 95, № 15. P. 8727–8732.
 28. Hitoshi N., Ken-ichi Y., Jun-ichi M. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector // *Gene.* 1991. Vol. 108, № 2. P. 193–199.
 29. Raab J.R. et al. Human tRNA genes function as chromatin insulators // *EMBO Journal.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 31, № 2. P. 330–350.
 30. Ebersole T. et al. tRNA genes protect a reporter gene from epigenetic silencing in mouse cells // *Cell Cycle.* 2011. Vol. 10, № 16. P. 2779–2791.
 31. Lee N.C. et al. Protecting a transgene expression from the HAC-based vector by different chromatin insulators // *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013. Vol. 70, № 19. P. 3723–3737.
 32. Bi L. et al. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A // *Nat Genet.* 1995. Vol. 10, № 1. P. 119–121.
 33. Liskovyykh M. et al. Stable maintenance of de novo assembled human artificial chromosomes in embryonic stem cells and their differentiated progeny in mice // *Cell Cycle.* 2015. Vol. 14, № 8. P. 1268–1273.
 34. Ikeno M. et al. Construction of YAC–based mammalian artificial chromosomes // *Nat Biotechnol.* 1998. Vol. 16, № 5. P. 431–439.
 35. Pesenti E. et al. Generation of a Synthetic Human Chromosome with Two Centromeric Domains for Advanced Epigenetic Engineering Studies: research-article // *ACS Synth Biol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 7, № 4. P. 1116–1130.
 36. Sanada C. et al. Mesenchymal stem cells contribute to endogenous FVIII:c production // *J Cell Physiol.* 2013. Vol. 228, № 5. P. 1010–1016.
 37. Tomizuka K. et al. Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice // *Nat Genet.* 1997. Vol. 16, № 2. P. 133–143.
 38. Suzuki N. et al. Human artificial chromosomes constructed using the bottom-up strategy are stably maintained in mitosis and efficiently transmissible to progeny mice // *Journal of Biological Chemistry.* 2006. Vol. 281, № 36. P. 26615–26623.
 39. Moralli D., Monaco Z.L. Developing de novo human artificial chromosomes in embryonic stem cells using HSV-1 amplicon technology // *Chromosome Research.* 2015. Vol. 23, № 1. P. 105–110.
 40. Chan D.Y. et al. Multigene human artificial chromosome vector delivery with herpes simplex virus 1 amplicons // *Exp Cell Res.* Elsevier Inc., 2020. Vol. 388, № 2. P. 111840.
 41. Sinenko S. et al. Transfer of Synthetic Human Chromosome into Human Induced Pluripotent Stem Cells for Biomedical Applications // *Cells.* 2018. Vol. 7, № 12. P. 261.

42. Pikaart M.J., Recillas-Targa F., Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators // *Genes Dev.* 1998. Vol. 12, № 18. P. 2852–2862.
43. Suzuki N. et al. Cell to cell transfer of the chromatin-packaged human β -globin gene cluster // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 38, № 5.
44. Wurm F.M., Hacker D. First CHO genome // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 29, № 8. P. 718–720.
45. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // *Nat Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 11. P. 1393–1398.
46. Hasegawa K., Nakatsuji N. Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 520, № 1–3. P. 47–52.
47. Kurosaki H. et al. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome // *J Hum Genet.* 2011. Vol. 56, № 10. P. 727–733.
48. Yakura Y. et al. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system // *Biochem Biophys Res Commun.* 2013. Vol. 431, № 2. P. 336–341.