

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Кафедра «Биофизика»

Диссертация допущена к защите

Зав. кафедрой, проф.

_____ Скворцов А.Н.

"__" _____ 2015 г.

ДИССЕРТАЦИЯ
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ МАГИСТРА

по теме:

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ У
МЫШИ

Направление: 011200.68 – Физика

Магистерская программа: 011200.68.02 – Биофизика

Выполнил студент гр. 63417

А.А. Кузьмин

(подпись)

Руководитель, Ph.D., н.с.

С.А. Синенко

(подпись)

Рецензент, к.б.н., доц.

Т.П. Санькова

(подпись)

Санкт-Петербург 2015

Реферат

с. 59, рис. 7, табл. 1.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИСКУССТВЕННАЯ ХРОМОСОМА ЧЕЛОВЕКА, ДИСФЕРЛИНОПАТИЯ, ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ, ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ.

В данной работе была поставлена цель: получить и охарактеризовать линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши для дальнейшего их использования в генной терапии дисферлинопатии у мыши, а также показать, что искусственная хромосома человека, используемая в данной генотерапевтической модели, удовлетворяет всем необходимым требованиям.

В результате были получены колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с использованием лентивирусной индуцибельной системы. Данные клетки были в состоянии экспрессировать эндогенный маркер стволовости Oct4 и обладали плюрипотентными свойствами. Искусственная хромосома, предназначенная для переноса в полученные клетки, присутствовала в донорных клетках в виде отдельной хромосомы и экспрессировала целевой терапевтический ген.

Summary

STEM CELLS, HUMAN ARTIFICIAL CHROMOSOME,
DYSFERLINOPATHY, GENE THERAPY, PLURIPOTENCY.

p. 59, fig. 7, tab. 1.

The aim of this work was to develop and to characterize several clones of murine induced pluripotent stem cells for their future use in the genetic therapy of dysferlinopathy model in mice, and to confirm that human artificial chromosome which was previously developed for this model is ready for the further experimental stage.

Colonies of $Dysf^{-/-}$ iPS cells were created by using inducible lentiviral system. Their stemness and pluripotency were confirmed as they express the endogenous Oct4 marker, and give rise to all three germ layers in the teratoma tumors. We have shown that the previously developed human artificial chromosome is well maintained as an episome unit, and it express the required therapeutic gene inside the donor cells.

Оглавление

Введение	8
1. Обзор литературы	9
1.1. История открытия плюрипотентных стволовых клеток	10
1.2. Методы получения плюрипотентных стволовых клеток	11
1.2.1. Метод переноса клеточных ядер	11
1.2.2. Метод клеточного слияния	12
1.2.3. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток при помощи мастер транскрипционных факторов	13
1.2.3.1. История разработки подходов по репрограммированию клеток	13
1.2.3.2. Факторы, используемые в репрограммировании	14
1.2.3.2.1. Oct4	15
1.2.3.2.2. Sox2	16
1.2.3.2.3. Klf4	16
1.2.3.2.4. c-Myc	17
1.2.3.3. Методы и системы, используемые в получении плюрипотентных стволовых клеток	17
1.3. Генная терапия	19
1.4. Искусственные хромосомы человека	22
1.5. Дисферлин и дисферлинопатия	26
1.5.1. Мышечные дистрофии	26
1.5.2. Дисферлинопатии и белок дисферлин	27
1.5.3. Подходы к терапии дисферлинопатий	28
2. Материалы и методы	29
2.1. Упаковка вирусных частиц	29
2.2. Трансфекция кальций-фосфатным методом	29
2.3. Титрование вирусных частиц	30
2.4. Получение первичных фибробластов из мышей линии $Dysf^{f/-}$	30
2.5. Получение индуцированных плюрипотентных клеток мыши	31
2.6. Покрытие чашек для культивирования	32
2.6.1. Покрытие желатином	32
2.6.2. Покрытие митотически-инактивированными фибробластами	32
2.7. Тест на формирование тератом	33
2.7.1. Приготовление срезов тератом	33
2.7.2. Окраска гематоксилином-эозином	33
2.8. Иммуно-флуоресцентное окрашивание клеток	34
2.9. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> , FISH анализ	35

2.9.1. Приготовление препаратов метафазных пластинок.....	35
2.9.2. Синтез зондов для гибридизации.....	35
2.9.3. Гибридизация препаратов метафазных пластинок с, мечеными флуоресцентными зондами.....	36
2.10. ПААГ-электрофорез и вестерн блоттинг.....	36
3. Результаты и обсуждение	38
3.1. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши мутантных по гену дисферлина ($Dysf^{-/-}$) с помощью лентивирусной системы.....	38
3.2. Полученные иПС клетки экспрессируют эндогенной Oct4.....	42
3.3. $Dysf^{-/-}$ иПС клетки формируют тератомы с производными трёх зародышевых листков	44
3.4. Независимое положения искусственной хромосомы, несущей рекомбинантный ген $Dysf$, в СНО клетках.....	46
3.5. Подтверждение экспрессии экзогенного дисферлина в донорных СНО клетках.....	47
3.6. Обсуждение.....	49
Выводы	51
Список используемых источников	52

Список использованных сокращений

AAV – Adeno-associated virus

C/EBP α – CCAAT/enhancer binding protein

Cas – CRISPR-associated protein

CEN – Centromere

CENP – Centromere protein

CHO – Chinese hamster ovary

c-Myc – V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CRISPR – Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat

ERAV – Equine rhinitis A virus

Fbx15 – F-box protein 15

FMDV – Foot-and-mouth disease virus

FSHD – Facioscapulohumeral dystrophy

HEK – Human embryonic kidney

HMG – High mobility group

HOR – High-order repeats

HPRT – Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

IRES – Internal ribosomal entry site

Klf4 – Kruppel-like factor 4

LGMD – Limb-girdle muscular dystrophy

LTR – Long terminal repeat

MMCT – Microcell-mediated chromosome transfer

MMLV – Moloney murine leukaemia virus

Nanog – Nanog homeobox

Oct3/4, Pou5f1, Oct4 – POU domain, class 5, transcription factor 1

OPMD – Oculopharyngeal muscular dystrophy

OSKM – Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

RCA – Rolling circle amplification

RPM – Revolutions per minute

Sox2 – SRY (sex determining region Y)-box 2

TALLEN – Transcription activator-like effector nuclease

TAR – Transformation-associated recombination

tetOP – Tetracycline operator minimal promoter

WRE – Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element

YAC – Yeast artificial chromosome

ZFN – Zinc-finger nuclease

ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека

иПС – Индуцированные плюрипотентные стволовые

ИХЧ – Искусственная хромосома человека

ПААГ — Полиакриламидный гель

ЭК – Эмбриональная карцинома

ЭС – Эмбриональные стволовые

Введение

Большой прогресс последних десятилетий в генетике и молекулярной биологии дал развитие множеству методов генной терапии, направленных на коррекцию тех или иных заболеваний человека. В последнее время развитие клеточных технологий и, в первую очередь, исследования в области стволовых клеток дали начало так называемой тканезаместительной терапии на основе использования разных типов стволовых и плюрипотентных клеток. В свою очередь, плюрипотентные стволовые клетки, являясь предшественниками всех клеток организма, имеют огромный потенциал для тканезаместительной терапии.

Генетическая терапия представляет собой метод лечения врожденных и приобретенных заболеваний, вызванных потерей функции отдельных генов, с помощью восстановления их функции рекомбинантными аналогами. Одно из генетических заболеваний, причиной которого является мутация в гене дисферлина, является мышечная дистрофия, называемая дисферлинопатией. Главная функция белка дисферлина вовлечена в поддержании стабильности и репарации клеточной мембраны клеток мышц. Данное заболевание имеет широкий круг мышечных нарушений, и может развиваться в любом возрасте, что повышает актуальность поиска методов, направленных на его лечение.

В настоящее время ведутся поиски методов, которые могли бы эффективно корректировать подобные патологические состояния. Одним из таких многообещающих методов, является использование искусственных хромосом, которые могут нести в себе целые гены, или группы генов со всеми регуляторными последовательностями и обеспечивать правильное функционирование и регуляцию трансгена в реципиентных клетках, в качестве которых, в большинстве случаев, выступают стволовые клетки. В свою очередь использование новых сконструированных генетических конструкций в составе искусственных хромосом требует анализа их эффективности и безопасности с помощью использования модельных организмов, в частности мышинной модели.

Целью данной работы является: получить и охарактеризовать линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мышей, дефектных по гену дисферлина для дальнейшего генотерапевтического использования.

В соответствии с поставленной целью, было необходимо решить ряд задач:

1) Получить первичные фибробласты из мышей мутантных по гену дисферлина ($Dysf^{-/-}$) и провести их репрограммирование с помощью лентивирусной системы;

2) Получить индивидуальные иПС клоны ($Dysf^{-/-}$) и подтвердить наличия в них эндогенной экспрессии плюрипотентного маркера Oct4;

3) Подтвердить плюрипотентные свойства полученных линий иПС клеток с помощью анализа формирования тератом и наличие в них производных 3-х зародышевых листков;

4) Подтвердить независимое положение искусственных хромосом, несущих ген $Dysf$ в донорных СНО клетках, предназначенных для перенесения в полученные иПС клетки;

5) Подтвердить экспрессию экзогенного дисферлина в донорных СНО клетках.

1. Литературный обзор

1.1. История открытия плюрипотентных стволовых клеток

Первые упоминания о стволовых клетках были известны ещё с конца XIX века, когда немецкий учёный Эрнст Хекель, поддерживая теорию эволюции Дарвина, представил эволюционное дерево, в основании которого был предшественник всех многоклеточных, одноклеточный организм – «Stamzelle», что с немецкого означает стволовая клетка [1].

Но более основательное их изучение началось в середине XX века с работ по изучению тератокарцином. Эти опухоли – редкое явление, представленные, в основном, в гонадах, включают в себя случайный набор зрелых тканей и недоразвитых органов, состоящих из разного типа клеток взрослого организма [2]. В 1954 году, Стивенс и Литтл, ведя исследования тестикулярной тератомы, заметили, что неопластические клетки опухоли обладают способностью к дифференцировке в клетки различных типов тканей, а также отметили, что эмбриональные плюрипотентные клетки способны, с одной стороны, дифференцироваться в клетки различных типов, а с другой, поддерживать свое плюрипотентное состояние. Уже в 1961 году, Пирс и Верни смогли наблюдать за дифференцировкой полученных эмбриональных телец в культуре, а в 1968, Гарднер показал, что клетки внутреклеточной массы бластоцисты, полученные от одной мыши и пересаженные в бластоцисту другой, способны давать полноценных химерных животных. В 1970 году Сато и Эфрусси с коллегами получают клональные культуры клеток эмбриональной карциномы (ЭК). В 1974 году, Бринстер публикует данные об участии ЭК клеток, перенесённых в бластоцисту, в эмбриональном развитии, а в 1975 году, Мартин и Эванс ведут наблюдения за широкой дифференцировочной способностью ЭК клеток *in vitro* и замечают схожесть формирования эмбриональных телец с ранними событиями дифференцировки в мышинном эмбрионе. В то же время, Минц и Иллменси получают нормальную химерную мышь из ЭК клеток, инъецированных в бластоцисту.

Поворотным моментом можно назвать начало 80-х годов. В 1981 году, Эванс и Кауфман демонстрируют, что плюрипотентные клетки, изолированные из ранних эмбрионов, ведут себя схоже с ЕС клетками, полученными из тератокарциномы. Тем временем, Гэйл Мартин получает образующие тератокарциномы плюрипотентные клеточные культуры из мышинных эмбрионов и вводит термин эмбриональных стволовых (ЭС) клеток. А в 1984 году, Лиз Робертсон, Алан Брэдли с коллегами показывают, что химерные мыши, полученные из ЭС клеток, содержат потомков этих клеток не только в соматических, но и в гермальных клетках [2,3]. В дальнейшем, количество работ по изучению ЭС клеток росло, их потенциал раскрывался всё шире, и встала необходимость поиска методов, направленных на получение плюрипотентных стволовых клеток.

1.2. Методы получения плюрипотентных стволовых клеток

Изначально, в качестве плюрипотентных стволовые клетки, использовались линии ЭС клеток, получаемых из мышинных эмбрионов [4]. Но использование данного метода для человека влечёт за собой ряд проблем. Первая, это этическая проблема, связанная с вмешательством в эмбриональное развитие и гибелью эмбрионов. Вторая проблема связана с иммунологической несовместимостью, возникающей из-за появления иммунной реакции на трансплантируемые клетки. Также, среди недостатков этих подходов – дорогостоящие подобные процедуры, высокая вероятность контаминации [5]. Существует три основных метода для получения плюрипотентных стволовых клеток: перенос клеточных ядер, клеточное слияние и введение транскрипционных факторов. В результате использования этих подходов, ядра терминально дифференцированных соматических клеток становятся способными к экспрессии генов, свойственных эмбриональным стволовым клеткам [6].

1.2.1. Метод переноса клеточных ядер

В данном случае, ядерное репрограммирование происходит за счёт помещения ядра в новое цитоплазматическое окружение. Ядро, полученное из частично или полностью дифференцированной клетки, трансплантируется в энуклеированные яйцеклетки, находящиеся во второй мейотической метафазе, в результате этого развивается бластоциста, из которой можно получить эмбриональные стволовые клетки, способные давать начало всем типам клеток взрослого организма [7, 8].

Эксперименты показали, что нет молекулярных или биологических различий между ЭС клетками, полученными из оплодотворённых эмбрионов, и ЭС клетками, полученных при помощи ядерного переноса. И в том и другом случае ЭС клетки могут использоваться для терапевтических целей. Однако нужно отметить, что последний метод не достаточно эффективен. Связано это с нарушениями в репрограммировании, в результате которого гибнет большинство клонов. На молекулярном уровне, эпигенетические модификации, специфичные для дифференцированных клеток, должны претерпевать изменения, для соответствия таковым в ЭС клетках. Но зачастую, при ядерном переносе, эпигенетический статус меняется не полностью, и соответственно нарушается запуск всех эмбриональных генов. Поэтому, наиболее эффективным репрограммирование, при ядерном переносе, было в случае, когда донорными клетками являлись взрослые стволовые клетки или клетки-предшественники[8,9].

1.2.2. Метод клеточного слияния

Существуют специальные методы, при помощи которых эмбриональные стволовые клетки могут быть слиты с обычными фибробластами, что в результате даёт гибридную клетку, которая поддерживает тетраплоидный состав ядра и имеет морфологию, характеристики роста и экспрессии характерные для ЭС клеток. Дифференцировка гибридных клеток *in vitro* и *in vivo* показывает их способность давать начало клеткам трёх типов зародышевых листков[10].

Клеточное слияние в контексте репрограммирования может быть быстрее и эффективнее, чем другие основные методы, т.к. ЭС клетки, используемые для клеточного слияния предоставляют все факторы, необходимые для поддержания плюрипотентности. Однако, полученные в результате клетки, содержат два полных генома от двух типов клеток, что является очевидным барьером для их применения. Один из предложенных и опробованных методов для избегания этих проблем заключался в использовании энуклеированных ЭС клеток, по аналогии с ядерным переносом [11], но таких попыток предпринималось мало. Большую популярность набирал третий способ репрограммирования: репрограммирование при помощи введения в клетку экзогенных транскрипционных факторов, необходимых для развития и поддержания плюрипотентного состояния.

1.2.3. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток при помощи мастер транскрипционных факторов

1.2.3.1 История разработки подходов по репрограммированию клеток

Одними из первых экспериментов по редифференцировке клеток одного типа в другой, были эксперименты по дифференцировке фибробластов в мышечные клетки, при помощи гена MyoD [12]. До этого, в 1973 году, Питер Джонс, работающий в детском госпитале в Лос Анджелесе, проводил скрининг эффекта хемотерапевтических лекарств на культивируемых фибробластах, и заметил, что чашка с добавленным препаратом азациитидином содержала уже не фибробласты, а видимые глазу мышечные волокна. Также было показано, что это препарат способен индуцировать дифференцировку 10T1/2 фибробластов в адипоциты и хондроциты [12]. В 1987 году, Дэвис с коллегами пришли к выводу, что данное фенотипическое переключение связано с активацией гена MyoD и показали, что его форсированная экспрессия приводит к такого рода последствиям[13].

Позже, Граф с коллегами продемонстрировали, что В- и Т-клетки могут быть конвертированы в функциональные макрофаги при эктопической экспрессии миелоидного транскрипционного фактора C/EBP α . Исследователи так же идентифицировали набор транскрипционных факторов, которые индуцируют превращение панкреатических клеток в инсулин-продуцирующие β -клетки, факторы способные дифференцировать фибробласты в нейроны. Эти эксперименты показали, что такие превращения не ограничены клеточным типом или принадлежности их к тому или иному зародышевому листку. Данные работы построили интеллектуальный фундамент для более систематичного и интенсивного поиска факторов, которые способны переводить обычные клетки в плюрипотентное состояние [14].

Так, в 2006 году, японские учёные, Такахаши и Яманака, выбрали 24 гена, как кандидаты в факторы, способные индуцировать плюрипотентность в соматических клетках. Чтобы оценить эти гены, они разработали метод, позволяющий детектировать индукцию плюрипотентности, за счёт введения кассеты, содержащей ген бэта-галактозидазы и резистентности к неомицину под контролем гена Fbx15 мыши, ответственного за поддержание плюрипотентности и эмбриональное развитие мыши. Они ввели каждый из 24 генов в мышинные фибробласты, содержащие эту конструкцию, и обнаружили, что не один из этих факторов в отдельности не смог вызвать индукцию плюрипотентности. Напротив, введение всех 24 кандидатов вместе, давало колонии, которые можно было назвать иПС клетками, индуцированные 24 факторами. Далее, чтобы определить, какие из кандидатов наиболее важны, они изымали факторы из пула трансдуцированных генов, и определили 10, изъятие которых убирает способность к формированию плюрипотентных клеток. После этого они проделали тоже самое с этими 10-ю факторами, пока не остались общеизвестные сейчас, как факторы плюрипотентности: Oct3/4, Klf4, Sox2 и c-Myc (сокращенно – OSKM факторы) [15].

1.2.3.2. Факторы, используемые в репрограммировании

1.2.3.2.1. Oct4

POU-доменный транскрипционный фактор Oct4, или Pou5f1, является центральным в поддержании плюрипотентности ЭС клеток и дифференцировке в специфичные линии. Уровень Oct4 должен тщательно регулироваться для поддержания ЭС статуса. Уменьшение уровня Oct4 на 50% индуцирует дифференцировку в трофобластодерму, тогда как увеличение на 50% ведёт к дифференцировке в мезодерму или энтодерму. Oct4 регулирует транскрипционную программу ЭС клеток главным образом при взаимодействии с транскрипционными факторами Sox2 и Nanog[21].

Характер экспрессии Oct4 пространственно и количественно меняется на протяжении эмбрионального развития мыши. Одинаковый уровень мРНК Oct4 можно найти в неоплодотворённом ооците и в зиготе после 0.5 дней с момента оплодотворения. Между 2- и 4-клеточной стадией эмбрионального развития уменьшается уровень материнского Oct4. На промежутке между морулой (2.5 дня после оплодотворения) и бластоцистой (3.5 дня) наблюдается активация уже внутренней экспрессии Oct4. Oct4 не экспрессируется в трофобластодерме на 4.5 день развития бластоцисты и его мРНК детектируется только в эпибласте на 5.5 день. Регуляция его на разных этапах развития тоже отличается. В отличие от зависимости Oct4 от своего дистального энхансера на ранних стадиях развития, в эпибласте экспрессия Oct4 управляется проксимальным энхансером[22].

Кроме этого, Oct4 является пионерным транскрипционным фактором, который, для поддержания плюрипотентности и запуска ранних программ дифференцировки, занимает различные участки ДНК, в разных конфигурациях, самостоятельно или в комплексе с другими факторами транскрипционной регуляторной сети[23].

1.2.3.2.2. Sox2

Sox2 принадлежит семейству HMG(high mobility group) — доменных ДНК-связывающих белков, функциями которого является регуляция транскрипции и

хромосомной архитектуры. Sox2 формирует комплекс с белками Oct4 или Oct1 на энхансерных ДНК последовательностях Fgf4[24]. Это позволяет Sox2 участвовать в регуляции клеток внутреклеточной массы бластоцисты и их потомков. Помимо экспрессии в ЭС клетках, Sox2 также экспрессируется в нейрональных стволовых клетках. Исследования показали, что Sox2 принимает активное участие в развитии эктодермы и потеря его функции ведёт к тотальным нарушениям эмбриогенеза [25]. Кроме этого, Sox2 кооперирует с Oct4, участвуя в регуляции таких важных генов для эмбрионального развития, как Nanog, UTF1, а также в регуляции самого Oct4[26].

1.2.3.2.3. Klf4

Kruppel-like factor 4 (Klf4) принадлежит к Klf семейству цинк-пальцевых транскрипционных факторов. Klf4 экспрессируется во множествах тканях и играет важную роль во многих физиологических процессах, включая пролиферацию, терминальную дифференцировку и апоптоз. В зависимости от целевого гена, Klf4 может активировать или репрессировать транскрипцию, а также функционировать как онкоген или опухолевый супрессор. Klf4 играет важную роль, вместе с другими белками этого семейства, в самообновлении ЭС клеток. Экспрессия Klf4 предотвращает дифференцировку ЭС клеток в ответ на изъятие Lif. В дополнение, он связывается с промотерными участками гена Nanog, и регулирует его экспрессию[27].

1.2.3.2.4. c-Myc

c-Myc относится к группе “спираль-петля-спираль” транскрипционных факторов, участвующий в регуляции большого количества генов (15% генов многоклеточных организмов). c-Myc является протоонкогеном, наиболее часто встречающимся онкогеном, вовлечённым в развитие 20% всех случаев рака человека. Кроме того c-Myc принимает участие в сплайсинге и репликации ДНК. Исследования показывают, что c-Myc регулирует транскрипцию через несколько механизмов, включающих привлечение гистон-ацетилаз, хроматин-

модулирующих белков, базальных транскрипционных факторов и ДНК метилтрансфераз[28]. Показана роль с-Мус в мобилизации гематопозитических стволовых клеток, участие в регуляции дифференцировки ЭС клеток, а также в хромосомной доступности для других факторов[29]. Но не смотря на то, что в первоначальных экспериментах, с-Мус использовался как обязательное составное звено репрограммирующих систем, было показано, что он не обязателен для успешного репрограммирования клеток[30].

1.2.3.3. Методы и системы, используемые в получении плюрипотентных стволовых клеток

Репрограммирование клеток зависит не только от факторов, выбранных для этого и систем их доставки, но и от типа репрограммируемых клеток. Для примера, чтобы репрограммировать мышинные эмбриональные фибробласты, используя ретровирусы, необходимо 8-12 дней, тогда как для того же процесса в человеческих фибробластах должно пройти 20-25 дней. Фибробласты остаются наиболее популярными донорными типами клеток и используются более чем в 80% всех опубликованных экспериментах по репрограммированию. Чтобы улучшить получаемые результаты, часть исследователей изучают способность к репрограммированию других типов клеток. Например, в сравнении с фибробластами, человеческие кератиноциты, трансдуцированные OSKM факторами, репрограммируются в 100 раз более эффективно и в два раза быстрее[16].

Среди методов доставки транскрипционных факторов к клеткам-реципиентам можно выделить интегрирующие и неинтегрирующие векторные системы. К интегрирующим системам относятся ретровирусные векторы. Для репрограммирования используются вирусы, не способные к размножению, у таких векторных систем удалены гены, отвечающие за дополнительную репликацию вирусного генома и сборку в капсид. Такие вирусы доставляют целевые гены в клетку, избегая её лизиса и смерти. Такие векторные системы способны нести конструкции со вставкой длиной до 10kb, в зависимости от

типа вектора. К недостаткам этих векторов можно отнести не способность проникать в неделящиеся клетки, и их встраивание в геном, опосредующее инсерционный мутагенез. Подобные векторные системы использовал Яманака в своей пионерской работе по репрограммированию, где каждому фактору соответствовал свой ретровирус. В данном случае, использовался вектор, основанный на MMLV (Moloney murine leukaemia virus) – ретровирусе, где трансген находился под 5’MMLV LTR(long terminal repeat) промотером[17].

Альтернативой ретровирусам являются лентивирусные векторы. Лентивирусы относятся к субклассу ретровирусов которые способны инфицировать и неделящиеся и неделящиеся клетки, встраивая в геном целевую конструкцию. Один из подходов, направленных на увеличение эффективности инфекции и экспрессии факторов репрограммирования, предприняла группа Рудольфа Йениша, создав конструктор, представляющий из себя полицистронный вектор, содержащий четыре стандартных фактора репрограммирования OSKM, разделённые 2A пептидами[18] (Рис 1).



Рисунок 1. Система репрограммирования, использующая полицистронный вектор и трансактиватор[19].

2A пептиды изначально найдены и охарактеризованы в афтовире ящура. Длина этих пептидов составляет 18-22 аминокислот в длину, они содержат высококонсервативный С-терминальный D(V/I)EXNPGP мотив, который опосредует «рибосомальный пропуск, скачек». Есть различные названия этих пептидов, зависящие от того, в каком вирусе они найдены(F2A для вируса ящура FMDV, E2A для вируса лошадиного ринита ERAV и т.д.). В описанной конструкции используются три разных пептида. Данная комбинация пептидов была найдена экспериментально, как наиболее эффективная для экспрессии этих факторов, и в данном контексте репрограммирования клеток [18]. Использование этих пептидов позволяет существенно увеличить экспрессию

связанных ими генов, по сравнению с IRES (internal ribosomal entry sites) элементами.

Тетрациклин-индуцируемый лентивирусный вектор сконструирован так, что экспрессия генов контролируется тетрациклин-зависимым минимальным промотором (tetOP), содержащим FUW конструкцию, состоящую из человеческого убиквитин-с промотора, показывающего наиболее стабильную экспрессию среди клеток различного типа, посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурка (WRE) и ВИЧ-1 «флэп» элемента, предназначенный для увеличения титра пакующегося вируса [20]. Отсюда название – tetO-FUW-OSKM. Так как данная конструкция содержит тетрациклин зависимый промотор, то необходим второй трансактиваторный вектор, в основе которого также входит FUW лентивирус, содержащий трансактиватор, который в присутствии доксициклина запускает транскрипцию основного вектора по tet-ON механизму (Рис 1). Полученная конструкция, за счёт уменьшения количества вирусов, существенно увеличивает эффективность репрограммирования и уменьшает вероятность инсерционного мутагенеза.

1.3. Генная терапия

Генетическая терапия – один из наиболее интенсивно развивающихся направлений современных биомедицинских исследований. Генная терапия предлагает новые возможности для лечения многих приобретённых и наследственных заболеваний, которые невозможно вылечить с помощью доступных методов[31]. Генную терапию можно определить как совокупность методов, направленных на исправление врождённых и приобретённых дефектов организма, путём компенсации или редактирования неверной генетической информации или введении дополнительных свойств, вызывающих тот или иной терапевтический ответ организма.

В случае *ex vivo* генной терапии, специальные клетки, которыми могут быть стволовые, прогениторные или терминально дифференцированные клетки, изолируются из пациента или донора, культивируются *in vitro*, с

применением генетических манипуляций, и вводятся реципиенту для достижения временного или постоянного улучшения состояния. В сравнении с *in vivo* генной терапией, *ex vivo* терапия на прямую не воздействует на организм, выбранные клетки могут быть селектированы по необходимому количеству признаков, что повышает эффективность и безопасность терапии. Но, не смотря на все перспективы, существуют проблемы, требующие решения. Одна из таких проблем: культивирование необходимых клеток. Различные линии клеток культивируются и поддаются модификации с различной эффективностью, особенно это относится к дифференцированным взрослым клеткам, которые не способны к долгому поддержанию в культуре *in vitro*. Терминально не дифференцированные, прогениторные и особенно стволовые клетки частично лишены этих недостатков, но при работе с такими культурами возникает опасность неправильной дифференциации, и туморогенности используемых клеток. Другая из причин кроется в генетической модификации клеток. Большинство методов, основанных на введении генотерапевтического вектора в клетки реципиента могут вызывать инсерционный мутагенез, что также характерно и для *in vivo* терапии. Однако в последнем случае данный процесс мутагенеза контролировать сложнее. Кроме того для *in vivo* генотерапии важно существование тропизма, транспортирующих систем к целевым клеткам и тканям. Поскольку неправильная доставка целевой конструкции может вести к непредсказуемым нежелательным побочным эффектам [32,33].

Векторные системы, используемые в генной терапии, можно разделить на вирусные и не вирусные векторные системы. Самыми используемыми для доставки генетического материала в настоящее время являются модифицированные вирусы. Первыми вирусами, используемыми в генной терапии, были ретровирусы. Это класс РНК вирусов, которые способны создавать двунитевую ДНК по матрице РНК при помощи обратной транскриптазы и встраивать в геном реципиентной клетки при помощи кодируемого фермента – интегразы. Данная конструкция наследуется

дочерними клеткам, но существует опасность инсерционного мутагенеза, вызванная случайным ее включением в геном. Другим недостатком является неспособность проникать в ядро неделящейся клетки. В свою очередь использование лентивирусов (субкласс ретровирусов) позволяет инфицировать неделящиеся клетки. Длина вставки для такого типа вирусов колеблется в районе 8-12кб. Следующий тип вирусов – аденовирусы. Эти ДНК содержащие вирусы не встраиваются в геном хозяина. А также имеют более широкий круг клеток, которые они способны заражать, включая очень медленно делящиеся клетки. Однако, аденовирусы больше подвержены атаке со стороны иммунной системы, а также имеют довольно короткую возможную вставку – около 5кб. Более перспективными считаются аденоассоциированные вирусы, которые также способны инфицировать широкий круг делящихся и не делящихся клеток, но в отличии от аденовирусов, способны встраивать несущий ген в специфичный сайт на 19 хромосоме, почти с 100% точностью. Также, они не провоцируют сильный иммунный ответ, но, как и аденовирусы обладают малой ёмкостью (около 5кб). Следующий наиболее используемый вирус это вирус простого герпеса. Данный нейротропный вирус, имеет большой геном, и размер целевой конструкции может достигать до 40кб. Но он имеет нестабильную и непостоянную экспрессию трансгенов и не наследуется [34,35].

Проблема безопасности и относительно малого объёма терапевтической ДНК в векторных системах дали толчок для развития векторных систем, основанных не на вирусах. Наиболее простые не вирусные системы используют «голую» ДНК, доставляемую к целевым клеткам и тканям. Наиболее популярным является использование катионных липидно-нуклеиновых комплексов, основанных на липофектаме. К достоинствам таких систем можно отнести низкий уровень иммунного ответа, отсутствие риска инсерционного мутагенеза, лёгкость синтеза, большой размер целевой ДНК. Среди недостатков можно выделить низкую эффективность трансфекции, токсичность при высоких дозах, а также непродолжительную экспрессию в контексте делящихся клеток[36,37].

В последнее время большую популярность набирают методы терапии, основанные не на введении правильной копии дефектного гена, а на редактировании геномной информации, при помощи специальных редактирующих систем. К таким системам относятся ZFN (zinc-finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) и CRISPR-Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) системы. Эти генно-инженерные нуклеазы позволяют манипулировать геномной информацией, с высокой точностью и эффективностью внося двухцепочечные разрывы, которые могут репарироваться негомологичным присоединением концов, что нужно для удаления нежелательных функций, или гомологичной рекомбинацией, в присутствии донорной последовательности, что применяется для коррекции гена или для внесения трансгенной конструкции [38].

Просуммировав вышенаписанное, можно заключить, что идеальная векторная система, используемая в генной терапии должна соответствовать ряду требований: 1) быть способной включать в себя все последовательности, необходимые для полного функционирования и правильной регуляции гена, 2) иметь стабильную экспрессию вводимой последовательности во времени и пространстве, 3) не вызывать побочных эффектов, включающих инсерционный мутагенез и иммунный ответ, 4) легко собираться и доставляться к реципиентным клеткам или тканям.

1.4. Искусственные хромосомы человека

Искусственная хромосома человека (ИХЧ) – относительно новый инструмент генной терапии. ИХЧ имеет потенциал к преодолению многих проблем, которыми обладают системы, основанные на вирусах. Искусственная хромосома способна поддерживать себя, как дополнительную 47 хромосому в человеческих клетках, избегая инсерционного мутагенеза, связанного с интеграцией в хромосомы. Способность ИХЧ стабильно существовать после многих раундов клеточного деления и репликации, связанная с наличием функциональных кинетохор, также, минимизирует вероятность сайленсинга

терапевтического гена. ИХЧ имеет способность к многократному копированию и поддержанию терапевтического гена в единственном количестве на клетку. Способность таких искусственных хромосом нести целый геномный локус со всеми регуляторными элементами позволяет им точно воссоздать уровень экспрессии гена дикого типа, копия которого используется для терапии[39].

Существует два подхода для конструирования ИХЧ. Первый, «сверху-вниз» подход, основан на укорочении хромосомы с обоих концов, при помощи гомологичной рекомбинации. Согласно этой модели, хромосома человека (чаще всего 21 или 14) вводится в куриную линию клеток DT40, склонную к гомологичной рекомбинации. Помимо хромосомы, в клетку вводятся последовательности, имеющие теломерные повторы, необходимые для поддержания хромосомы, loxP сайт, соединённый с 5' участком гена HPRT для введения трансгена и его отбора, селективные маркеры, и, собственно, гомологичную последовательность к наиболее близким к центромере участкам, по которой идёт гомологическая рекомбинация. Для такой последовательности важно быть как можно ближе к центромерной области, чтобы избежать включения в хромосому ненужной дополнительной информации. Эта последовательность изолируется из участков p- и q- плечей хромосомы посредством TAR (transformation-associated recombination) клонирования. Этот процесс схож с репарацией разрывов путём гомологической рекомбинации. TAR-вектор, например YAC (yeast artificial chromosome), содержит специфичные к искомым последовательностям плечи гомологии на концах, дрожжевую центромерную последовательность (CEN) и селективный дрожжевой маркер. Этот вектор, вместе с целевой ДНК, трансформируется в дрожжевую клетку, где, путём гомологичной рекомбинации образуется кольцевой вектор, содержащий целевую последовательность вводимой ДНК, способный к репликации и селекции[40,41].

Второй и наиболее современный подход – «снизу-вверх». Заключается в создании альфоидной tetO-ИХЧ *de novo*, с использованием синтетической,

многократно повторяющейся, альфоидной ДНК-последовательности, содержащей в каждом повторе встроенный тетрациклиновый оператор. Плюс такого подхода в том, что данная ИХЧ может быть инактивирована экспрессией белков, слитых с тетрациклиновым репрессором (tetR).

Каждая человеческая хромосома содержит в центромерных областях повторы высокого порядка HOR (high-order repeats), содержащие так называемую альфоидную ДНК, необходимую для правильного функционирования центромеры. Для создания этой центральной последовательности, проводят амплификацию методом катящегося кольца (RCA, rolling circle amplification) димера, состоящего из альфоидной ДНК 17 хромосомы, содержащей CENP-B бокс, и синтетической альфоидной последовательности, содержащей tetO мотив, до 5-10кб в длину. Функциональный элемент, являющийся неотъемлемой частью искусственной хромосомы – CENP(centromere protein)-B box, необходим для *de novo* сборки и поддержания ИХЧ. Без него невозможна сборка CENP-A комплекса, специфичного варианта гистона H3, представленного в центромерной области. CENP-A необходим для сборки белков кинетохор и является маркером поддержания функциональных центромер[43]. На следующем этапе, RCA-амплифицированные фрагменты котрансформируются в дрожжевые клетки вместе с TAR-вектором, содержащим специфичные к альфоидной ДНК плечи. Рекомбинация конец к концу этих фрагментов и включение в состав TAR-вектора приводит к образованию дрожжевой хромосомы, размером, приблизительно 50кб длиной. После введения в человеческие HT1080 клетки, полученная последовательность мультимеризуется, образуя искусственную хромосому, длиной в 1.1Мб. Для введения гена интереса в полученную хромосому, в ИХЧ вводится loxP сайт, связанный с 5'-областью HPRT гена, путём гомологичной рекомбинации в DT40 клетках, а терапевтическая последовательность извлекается из генома человека, путём TAR-клонирования в дрожжевых клетках, также, для будущей вставки в искусственную хромосому, сюда добавляется loxP сайт, связанный с 3'-участком гена HPRT.

Далее, полученные конструкции переносятся в СНО клетки, котрансфецируются *cre*-рекомбиназой, и селекционируются по наличию целого HPRT гена, для обнаружения наличия вставки[42].

Неотъемлемой частью технологии ИХЧ является её перенос хромосомы из одного типа клеток в другой. Для этих целей используется так называемый метод ММСТ (*microcell-mediated chromosome transfer*) – хромосомный перенос, опосредованный микроклетками. На первом этапе этой процедуры, донорные клетки обрабатываются цитостатиками, например колцемидом, что блокирует клеточное деление на метафазе (однако при долгом воздействии колцемида, клетки могут выйти из блока и перейти к фазе G1). В их ядре не образуется митотического веретена, что приводит к тому, что каждая хромосома (или группа хромосом) находится в своей ядерной оболочке. Такие образования называются микроядрами. Далее, эти клетки центрифугируются при высоких скоростях (около 40000g,) в присутствии цитохалазина б, который нарушает целостность цитоскелета, таким образом разжижая клетки. В результате, при центрифугировании, образуются микроклетки, представляющие собой микроядра, содержащие одну или несколько хромосом, окруженные плазматической мембраной. Чтобы отобрать микроклетки, содержащие минимальное число хромосом, они подвергаются фильтрации через микронные фильтры (порядка 3мкм). Далее, отобранные микроклетки подвергаются слиянию с реципиентной клеткой, при помощи различных методов, в основном включающих в себя использование полиэтиленгликоля или белков вирусных оболочек и подвергаются селекции по маркеру, содержащемуся в целевой хромосоме. Как и любой метод, ММСТ не лишён недостатков. Эффективность метода довольно низкая, около 10^{-5} - 10^{-6} , при использовании полиэтиленгликоля. Т.к. эта процедура многоэтапная, то для улучшения эффективности, необходимо подбирать условия для каждого из них, начиная от использования цитостатиков, до методов слияния[44,45].

Использование стратегии, основанной на искусственной хромосоме человека, является многообещающим подходом, обладающим множеством

плюсов, но он также не лишён недостатков. Сам процесс является довольно трудоёмким, также он ограничен только *ex vivo* применением. Из этого вытекает другая проблема – доставка скорректированных клеток. Кроме этого, мало доставить эти клетки, нужно ещё добиться длительного поддержания их популяции в организме. Работы в этом направлении ведутся, и каждый год выходят работы, нацеленные на улучшение данного метода [46].

1.5. Дисферлин и дисферлинопатия

1.5.1. Мышечные дистрофии

Исторически, мышечные дистрофии определялись, как прогрессирующие миопатии, демонстрирующие замещение мышечных волокон в биопсиях адипозными и соединительными тканями. Клинические проявления дистрофий возможны при рождении – врождённые мышечные дистрофии, но могут не проявляться до старости. Дистрофии могут классифицироваться по времени (возрасту) появления, по наследуемости или по вовлеченности определённых групп мышц. Например, существуют конечносто-поясные мышечные дистрофии (LGMD, limb-girdle muscular dystrophy), лицелопаточноплечевые дистрофии (FSHD, facioscapulohumeral dystrophy), окулофарингеальные мышечные дистрофии (OPMD, oculopharyngeal muscular dystrophy), дистальные миопатии/дистрофии и скапулоперонеальные (scapuloperoneal) дистрофии. Наиболее всеохватывающей является классификация по дефектному гену, вызывающему тот или иной вид дистрофии (например: дисферлинопатии, дистрофинопатии, кальпаинопатии), потому что одно и то же генетическое нарушение в семье может приводить к различным фенотипическим последствиям. Мышечные дистрофии могут быть вызваны мутациями в генах, кодирующих сарколемные, саркомерные, ядерные структурные белки и ферменты. Также, некоторые нарушения вызываются мутациями, влияющими на сплайсинг мРНК, например миотонические дистрофии. Кроме того есть заболевания, механизмы которых до сих пор не ясны[47].

1.5.2. Дисферлинопатии и белок дисферлин

Исходя из названия, понятно, что дисферлинопатии – класс мышечных дистрофий, вызванных нарушениями в работе гена дисферлина. Ген дисферлина содержит 55 экзонов, экспрессирует белок, размером 230кДа, который представлен в широком диапазоне тканей, от печени до моноцитов, но особенно сильно экспрессируется в мышечных тканях. Дисферлин локализуется преимущественно в сарколемме, а также ассоциирован с цитоплазматическими везикулами[48]. Основной функцией дисферлина является его участие в репарировании плазматической мембраны. Согласно модели, при повреждении мембраны внеклеточный кальций проникает в мышечные волокна, образуя зону с высоким содержанием кальция. Клеточные везикулы, содержащие дисферлин на поверхности своей мембраны, в месте образовавшегося повреждения и в присутствии повышенной концентрации кальция сливаются друг с другом и с плазматической мембраной, образуя своеобразную заплатку. В этом процессе, дисферлин играет свою роль на этапе слияния, облегчая везикулярный докинг и собственно слияние с плазматической мембраной, путём взаимодействия с другими молекулами дисферлина на мембране и везикулах, а также с аннексинами и некоторыми другими неизвестными белок-связывающими партнёрами[49]. Помимо этой основной функции, дисферлин может координировать ремоделирование цитоскелета, через взаимодействие с компонентами фокальной адгезии. Также, дисферлин может быть вовлечён в секрецию цитокинов и/или хемокинов. Наконец, была показана роль дисферлина в эндотелиальной клеточной адгезии и ангиогенезе[50].

Клинические проявления дисферлинопатий очень вариабельны. У части пациентов, на первых этапах, нарушения обнаруживаются в дистальной мускулатуре (Миоши миопатии), но также возможны и обратные ситуации, когда проксимальное ослабление мускулатуры превалирует над дистальным (LGMD дистрофии). Более того, у пациентов возможны поражения совершенно разных групп мышц. Дисферлинопатии, в основном, дают о себе знать в

возрасте 16-23 лет, но также были случаи проявления этого заболевания в преклонном возрасте (70 и более лет)[51].

1.5.3. Подходы к терапии дисферлинопатий

На сегодняшний день нет средства, которое позволяет вылечить данное заболевание. Существует несколько подходов, направленных на терапию дисферлинопатий. Один из них — использование аденоассоциированных вирусов (AAV) для транспорта гена дисферлина в реципиентные клетки. Длина несомой вставки у AAV ограничена 4-5кб, что не позволяет переносить им целый ген дисферлина. Но они обладают свойством конкатемеризации. Используя это свойство, в клетки вводятся два вирусных вектора, содержащих по половине гена дисферлина, которые, после конкатемеризации и сплайсинга дают полноценный дисферлиновый транскрипт. Но данный метод довольно неэффективный и экспрессия дисферлина осуществляется не в полном объёме. Другой подход основан на использовании минигенов, когда AAV содержат в себе только часть гена дисферлина, который, экспрессируясь, даёт неполноценный белок дисферлина, но функционально активный и улучшающий состояние обработанных модельных животных. Похожий подход основан на экзонном пропуске, когда, в случае ноль-мутации в определённом экзоне дисферлина, прекращается его экспрессия. В данном случае, путём экзонного пропуска можно также добиться экспрессии неполноценного, но функционально-активного дисферлина [52].

К сожалению, все эти методы не позволяют повторять полноценную экспрессию дисферлина в реципиентных клетках, что требует поиска новых способов коррекции этого заболевания.

2. Материалы и методы

2.1. Упаковка вирусных частиц

Клетки линии НЕК293Т поддерживали на среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), содержащей 10% FBS (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2мМ L-глутамин. Для получения вирусных частиц клетки НЕК293Т трансфецировали кальций-фосфатным способом, одновременно вводя три плазмиды: tetO-FUW-OSKM, кодирующую репрограммирующие факторы или трансаактиваторную плазмиду FUW-M2rtTA (11 мкг), pMD2G (4мкг), содержащую ген вирусной оболочки env вируса везикулярного стоматита, и pCMVdR8.74PAX2 (8 мкг), содержащую gag-pol гены ВИЧ-1, необходимые для сборки вирусной частицы. На следующий день, с утра, заменяли среду на свежую и в последующие два дня собирали супернатанты, содержащие вирусные частицы. Общий объём супернатанта центрифугировали 3 минуты при 1200 RPM (revolutions per minute) для удаления клеточного дебриса, затем фильтровали его через 0.45 микронные фильтры (Millipore, Германия). Концентрирование вирусных частиц проводили путём высокоскоростного центрифугирования (Beckman, ротор JS-24.38, США) при 47000 g, 160С, 2 часа. Сконцентрированные вирусные частицы ресуспендировали в среде орti-MEM (Gibco, США) и инкубировали 16 часов при 40С, после чего делали аликвоты по 50мкл и замораживали на -800С до последующего использования.

2.2. Трансфекция кальций-фосфатным методом

Клетки НЕК293Т, рассеивали с расчётом (приблизительно 4×10^6 на 10-сантиметровую чашку для этой линии), чтобы в день трансфекции плотность составляла 70-80%. За два часа до трансфекции меняли среду на свежую. Готовили смесь для трансфекции: к раствору однократного ТЕ (Tris-EDTA buffer) (32,5мкл) и 2М CaCl₂(87,5мкл), добавляли необходимое количество ДНК и полученную смесь доводили водой до объёма 600 мкл, после чего, интенсивно перемешивая на вортексе, по капле, добавляли буффер HBS

(HEPES buffered saline: 280мМ NaCl, 50мМ Hepes, 1.5мМ Na₂HPO₄, pH=7.1) объемом 600мкл. Полученный раствор инкубировали 15 мин при комнатной температуре для образования преципитата, после чего его медленно по каплям добавляли к приготовленным клеткам HEK293T, клетки инкубировали с преципитатом в течении ночи при 37⁰С и 5% CO₂. Среду меняли на свежую через 16-18 ч.

2.3. Титрование вирусных частиц

Для титрования вирусных частиц, клетки HEK293T, за день до заражения, высевали на 24-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток на лунку. На следующий день добавляли свежую среду с добавлением вирусного супернатанта в количестве 10, 20, 50 мкл на лунку. Еще через день среду заменяли на новую. Через 72 часа после заражения (или по достижению клеток необходимой плотности) клетки фиксировали 4% параформальдегидом и проводили иммуноокрашивание на белок, кодируемый лентивирусным вектором (в нашем случае антителами к Oct4).

После окрашивания рассчитывали титр вирусных частиц. Эта величина выражается как TU/мл (TU = transforming units). Для этого подсчитывали процент светящихся клеток и, с учётом разведения вирусов и количества клеток при заражении, определяли количество растворенных активных вирусных частиц содержащихся в миллилитре стока. Например: если при окрашивании светятся 50% клеток, для заражения использовали 10^5 клеток (соответственно 5×10^4 клеток инфицировано), при этом объём супернатанта, добавленный в среду был равен 20 мкл. Значит 1 мкл стока вируса содержит $5 \times 10^4 / 20 = 2500$ вирусных частиц. Таким образом титр вируса составляет $2,5 \times 10^6$ TU/мл.

2.4. Получение первичных фибробластов из мышей линии Dysf^{-/-}

Отсеченные кончики хвостов (размером до 1 см) от 2-4 взрослых мышей линии Dysf^{-/-} обрабатывали раствором 70% этанола и помещали в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Далее хвостовые ткани измельчали стерильным

скальпелем до максимально возможного гомогенного состояния, ресуспендировали в растворе коллагеназы IV 1мг/мл (Sigma, США) в PBS, и инкубировали при 370С 15 минут. Ткани отмывали PBS и после центрифугирования (1200 RPM, 3 мин) инкубировали 20 минут с 0,05% раствором трипсина/EDTA (Gibco, США). Блокировали трипсин равным объёмом полной МЭФ среды, после центрифугирования (1200 RPM, 3 мин) осадок ресуспендировали и культивировали ткани в 6 см чашках с полной МЭФ средой с добавлением фунгизона (Invitrogen, США) при 370С, 5% CO₂. На 4-5 день образовавшийся слой фибробластов пассировали на две чашки со свежей МЭФ средой, среду меняли каждые 48 часов. Среда для эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ среда) состоит из DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium, Gibco, США), 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, США), 100 U/ml пенициллина, 100 U/ml стрептомицина (Gibco, США), 2мМ L-глутамин(Gibco, США), и 0,25 мкг/мл фунгизона (амфотерицин В). Клетки до 4 пассажа использовали в экспериментах по репрогаммированию, часть клеток замораживали в среде содержащей 80% МЭФ-среды, 10% FBS и 10% DMSO(Amresco, США).

2.5. Получение индуцированных плюрипотентных клеток мыши

Фибробласты, выделенные из хвостов взрослых мышей, культивировали на МЭФ-среде и рассеивали в лунки 6-луночного планшета, предварительно покрытые желатином в плотности 2×10^5 клеток на лунку. На следующий день среду аспирировали и к клеткам добавляли 600 мкл МЭФ среды и по 100 мкл каждого вирусного супернатанта tetO-FUW-OSKM и FUW-M2rtTA (титр вирусов не должен быть менее чем $2,5 \times 10^6$ TU/мл). После инкубации в течении 6-8 часов к клеткам добавляли 800 мкл свежей МЭФ среды, икубировали еще 16 ч, после чего заменяли среду на свежую. На следующий день и последующее культивирование клеток проводили на среде для эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭС среда), содержащей 5 мкг/мл доксициклина. мЭС среда содержит среду Knockout DMEM (Gibco, США), 15% фетальной коровьей

сыворотки FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma, США) сертифицированной для работы со стволовыми клетками, 100 U/ml пенициллина, 100 U/ml стрептомицина (Gibco, США), 2мМ L-Глутамин (Gibco, США), 50 мкМ бета-меркаптоэтанола (Sigma, США), 1х заменимых аминокислот NEAA (non-essential amino acids) (Gibco, США), ингибиторного фактора лейкемии LIF (Leukemia inhibitory factor) в рабочем разведении. Заменяли среду на свежую каждый день, на 4 день клетки снимали раствором трипсина и пересевали на 10 см чашки предварительно покрытые монослоем митомицин-инактивированных фибробластов мыши. Замену мЭС среды с доксициклином проводили каждый день или через день. Образовавшиеся клоны клеток, видимые невооружённым глазом, собирали, трипсинизировали и переносили в индивидуальные лунки 96-луночного планшета, предварительно покрытые слоем митомицин-инактивированных фибробластов. Колонии иПС клеток последовательно наращивали, так по достижению плотности около 70% клетки трипсинизировали и переносили соответственно в лунки 24- и 6-луночных планшетов, покрытых желатином или митомицин-инактивированными фибробластами. Затем иПС клетки культивировали на мЭС среде без доксициклина в 6 см культуральных чашках, покрытых желатином.

2.6. Покрытие чашек для культивирования

2.6.1. Покрытие желатином

Полученные иПС клетки культивировали на культуральных чашках предварительно покрытых желатином. Для этого культуральные чашки инкубировали с 0,1% водным раствором желатина (Sigma, США), в объёме достаточном для полного покрытия дна чашки в течении 30 мин при 37°C. Раствор желатина аспирировали, чашки промывали раствором PBS для последующего культивирования клеток.

2.6.2. Покрытие митотически-инактивированными фибробластами

Для получения митотически-инактивированных клеток, мышинные эмбриональные фибробласты, на 3 или 4 пассаже, при 100% плотности, культивировали в присутствии митомицина С (Sigma, Германия) с конечной концентрацией 10 мкг/мл 2.5-3 часа. После этого, среду отбирали, промывали клетки PBS, тщательно, несколько раз, обрабатывали трипсином, и пересевали на чашки или лунки, для последующего их использования в качестве подложки.

2.7. Тест на формирование тератом

Клетки полученных колоний собирали трипсинизацией с 10 см чашек, промывали один раз PBS, и в количестве $1-5 \times 10^6$ клеток в 100 мкл PBS вводили подкожно в бедренную область мышам линии NU/J (Jackson laboratory, США). Образование опухолей наблюдалось по прошествии 30 дней после инъекций, после чего мышей умерщвляли и извлекали опухоли для дальнейшего анализа.

2.7.1. Приготовление срезов тератом

Извлечённые тератомы промывали в PBS и фиксировали в 4% растворе параформальдегида. Образцы последовательно дегидрировали 70%-80%-96% растворами этанола и 100% изобутиловым спиртом, и переносили в растворы парафина (Paraplast, McCormick Scientific, США), для избавления от спиртов, в следующей последовательности: изобутанол:парафин (2:1), изобутанол:парафин (1:1), изобутанол:парафин (1:2). Затем 2 раза отмывали в цельном парафине и инкубировали в течении ночи при +600С. На следующий день тератомы заливали парафином в специальные формы, охлаждали и делали микросрезы толщиной 7-10мкм с помощью микротомы. Полученные срезы помещались на предметное стекло, предварительно смазанное яичным белком.

2.7.2. Окраска гематоксилином-эозином

Для окрашивания гематоксилином и эозином, предметные стекла отмывали от парафина в ксилоле и серии спиртов в следующей последовательности: ксилол

– 2 раза по 5 минут, 96%-80%-70% спирты по 2 минуты, далее промывали водой, инкубировали в растворе Гематоксилина 20 минут, снова промывали водой (сначала проточной, потом – дистиллятом), после – инкубировали в Эозине 1 минуту, опять промывали водой и дегидратировали в той же серии спиртов, но в обратном порядке: от 70% этанола к ксилолу. Окрашенные среды заключали в канадском бальзаме и покрывали покровными стёклами. После застывания заключающей жидкости препараты были готовы к анализу.

2.8. Иммуно-флуоресцентное окрашивание клеток

Культуру клеток в лунках планшета промывали 1 раз PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида в PBS при комнатной температуре 10-15 мин. Клетки отмывали 1 раз PBS и пермеабелизовали раствором 0,1% Triton X-100 (Sigma, США) в течении 15 мин. Далее, клетки снова промывали PBS и инкубировали в блокировочном растворе PBS-ТБО, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), 2% овечью сыворотку, 0,1% Tween-20 (Sigma, США) в PBS, 10-15 минут. Затем клетки инкубировали с мышинными антителами специфичными к Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:100 в PBS-ТБО, в течении ночи при +40С или 3 часа при комнатной температуре. Клетки отмывали 6 раз раствором 0,1% Tween-20 в PBS (PBS-T) по 5 мин. Клетки инкубировали со вторичными антителами, направленными против мышинных антител, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch, США), в PBS-ТБО в разведении 1:200, 1 час при комнатной температуре. Затем клетки промывали 4-5 раз раствором PBS-T и инкубировали с раствором 1 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, Германия) в PBS 1 мин, добавляли PBS и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert40 (Zeiss, Германия).

2.9. Флуоресцентная гибридизация *in situ*, FISH анализ

2.9.1. Приготовление препаратов метафазных пластинок

СНО клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста инкубировали 2 часа в среде с 100 нг/мл колцемида (Sigma, США). Клетки собирали с помощью стандартной трипсинизации, один раз отмывали в 1 мл PBS. К ресуспендированным клеткам медленно по капле добавляли 10 мл 0,56% раствора KCl, предварительно нагретого до 370С. Клеточную суспензию инкубировали при 370С в течении 20 мин. После этого клетки помещали в лёд на 1 мин и частично фиксировали их добавляя 8-9 капель раствора, содержащего 3:1 метанол и уксусную кислоту. Клетки центрифугировали 5 мин, 1500 RPM при 40С. Аккуратно ресуспендировали образовавшийся осадок, медленно, по каплям добавляя 1 мл фиксирующего раствора и инкубировали 20 мин на льду. Осаждали клетки центрифугированием при 1500 RPM, 5 мин, при 40С, и помещали на лед. Процедуру повторяли 3 раза, для полной фиксации клеток. Обработывали предметные стекла в 6N HCl и тщательно промывали их дистиллированной водой. С высоты 20-30 см капали по 2 капли клеточной суспензии на приготовленные сухие стекла и помещали в ламинар для высушивания.

2.9.2. Синтез зондов для гибридизации

Для синтеза зондов использовали ULYSIS® Nucleic Acid Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Целевые плазмиды (содержащие коровую последовательность хромосомы и целевой ген дисферлина) обрабатывали ДНКазой I. Полученные фрагменты, размером 100-1000 пар оснований, выделяли из геля после разделения на электрофореze в 1% агарозе. 2 мкг выделенной ДНК осаждали этанолом и растворяли в «labeling buffer»-е. Денатурировали зонды 5 мин при 95⁰С и охлаждали на льду. К денатурированным зондам добавляли, в зависимости от типа плазмиды, флуоресцентный краситель Alexa 488 или Alexa 546, и инкубировали их 15 мин при 800С с последующим охлаждением на льду. Затем меченные зонды очищали на хроматографических колонках (Biorad Micro Bio-Spin, США).

2.9.3. Гибридизация препаратов метафазных пластинок с мечеными флуоресцентными зондами

С помощью этанол преципитации приготовили аликвоты по 100 нг каждого из зондов. Зонды растворяли в смеси 10 мкл формамида с равным объёмом буфера для гибридизации, с добавлением 10 мкг ДНК спермы лосося. Смесь тщательно перемешивали и денатурировали 5 минут при 720С, с последующим инкубированием при 370С, 30 мин. Предметные стёкла с метафазными пластинками дегидратировали растворами с последовательными 70%-80%-96% концентрациями этанола, по 2 минуты для каждого. На каждое стекло помещали по 50 мкл денатурирующего раствора, накрывали его покровным стеклом и инкубировали 5 мин на нагревательном столике при 750С. Денатурацию останавливали промыванием в серии ледяных спиртов, по 2 мин в каждом. На высушенные стекла добавляли по 20 мкл раствора с зондами, накрывали покровными стеклами и инкубировали 16-18 ч в темноте при 370С. Препараты отмывали различными концентрациями SSC буфера (saline sodium citrate), последовательно, 2 минуты при комнатной температуре (КТ) в 2x SSC, 2 минуты при 720С в 0,4x SSC + 0,3% Tween20, и 2 мин при КТ в 2x SSC + 0,1% Tween20. На образцы наносили заключающую жидкость (vectashield mounting medium) (Vector Labs, США), заключали покровными стёклами и анализировали на конфокальном микроскопе TSC SP5 (Leica, Германия).

2.10. ПААГ-электрофорез и вестерн блоттинг

Для разделения проб, использовали вертикальную камеру для белкового электрофореза (BioRad). Приготовленный, 10% полиакриламидный гель, помещали в камеру, заполненную трис-глициновым буфером (25мМ Трис, 250 мМ Глицин, 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate)), лунки промывали, после чего наносили пробы в концентрации 15 мкг на лунку. Электрофорез проводили при напряжении 40V. По окончании, гель вынимали, его края обрезали. Перенос геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили полусухим методом. Для этого, между двумя графитовыми электродами помещали слои салфеток и 3мм

ватмана (Sigma, Германия), смоченные в буфере для переноса (90% трис-глицериновый буфер, 10% этанол), в количестве 5 штук снизу и сверху от мембраны и геля. Силу тока для переноса рассчитывали из соотношения 0,8 А/см² мембраны, напряжение ограничивалось до 25V. После переноса, мембрану извлекали, блокировали в 5% молоке (Milk powder, Blotting grade, ROTH), разведённом на PBS. Первичные антитела разводили в 1% молоке на PBS + 0,1% Tween-20 и инкубировали с мембраной ночь при температуре 40С. На следующее утро мембрану отмывали 3 раза по 10-15 минут в PBS + 0,1% Tween-20 и инкубировали со вторичными антителами (фирма), конъюгированными с пероксидазой хрена, разведёнными по аналогии с первичными, 1 час при комнатной температуре. После этого мембрану отмывали 3 раза по 15 минут в PBS + 0,1% Tween-20 и визуализировали на приборе Chemidoc™ XRS (BioRad, США) с использованием SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США).

3. Результаты и обсуждение

Целью данной работы было получение и характеристика линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши, дефектных по гену дисферлина, и анализ ранее сконструированных искусственных хромосом, несущих рекомбинантный дисферлин, для их дальнейшего генотерапевтического использования. Для достижения этой цели был поставлен ряд задач и получены результаты, описание которых будет дано ниже.

3.1. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши мутантных по гену дисферлина ($Dysf^{-/-}$) с помощью лентивирусной системы

В эксперименте по репрограммированию была выбрана система, описанная в литературе Рудольфом Йенишем и его группой [18]. Согласно этой модели, для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, используется лентивирусный вектор tetO-FUW-OSKM, в состав которого входят все четыре фактора: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, разделённые саморазрезающимися 2A пептидами. Данная система имеет преимущество, поскольку позволяет использовать единичный вирус вместо четырех, соответственно значительно уменьшая вероятность инсерционного мутагенеза, связанного с включением вирусного генома в геном клетки-реципиента. Кроме того, использование 2A пептидов, вместо IRES сайтов позволяет значительно усилить экспрессию вводимых кДНК последовательностей. В дополнение, из-за уменьшения количества вирусов, увеличивается количество реципиентных клеток, зараженных необходимым числом вирусов.

Данная конструкция, содержащая 4 рамки считывания, находится под контролем минимального промотора тетрациклинового оператора (tetOP). Для ее экспрессии необходим вспомогательный вирус, FUW-rtTA, несущий последовательность тетрациклинового трансаактиватора (rtTA). Только после взаимодействия с доксициклином rtTA белок может связываться с

минимальным промотором тетрациклинового оператора и тем самым вызывать эктопическую сверхэкспрессию Oct4, SOX2, KLF4, C-MYC в целевых клетках. Мы собирали оба лентивируса, содержащие, соответственно, полицистронный вектор tetO-FUW-OSKM, и трансактиваторный вектор FUW-M2rtTA. После сборки, вирусы концентрировали с помощью ультрацентрифугирования и проводили титрование вирусных частиц. Для этого, клетки линии HEK293T заражали обоими вирусами, используя 3 разведения для каждого: 10-, 20-, 50 мкл вируса на лунку (Рис. 2). Иммуно-флуоресцентное окрашивание на Oct4 показало, что наиболее эффективное инфицирование было при использовании по 50 мкл каждого концентрированного вируса (Рис. 2). Титр данных вирусов составил приблизительно $2,5 \times 10^6$ TU/мл. Кроме подсчёта титра, иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что полученные нами вирусы функционально активны, они экспрессируют экзогенный Oct4, входящий в состав полицистронной кассеты.

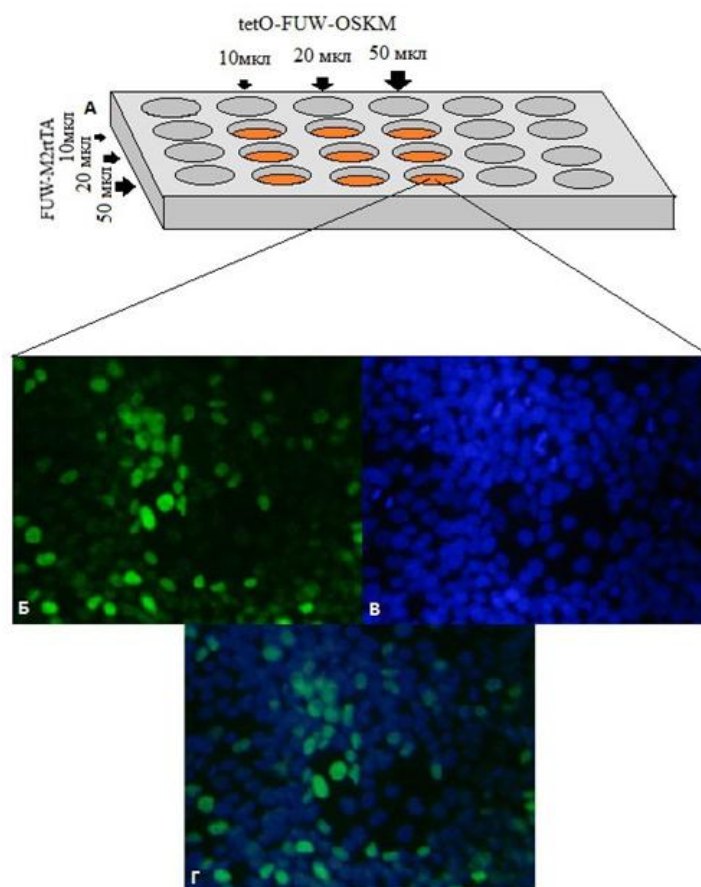


Рисунок 2. А: схематичное изображение эксперимента, указано стрелками количество раствора концентрированного вируса. Б: Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток HEK293T на Ost4 (зеленый). В: Окраска DAPI (синий). Г: Совмещенное изображение.

В качестве исходных клеток использовали первичные фибробласты взрослых $Dysf^{-/-}$ мышей, взятых из хвостовых тканей (Рис. 3, А). Фибробласты, находящиеся в логарифмической фазе роста, заражали вирусами, используя 100 мкл концентрированного раствора каждого вируса. На следующий день после заражения вызывали экспрессию репрограммирующих факторов посредством культивирования фибробластов в мЭС среде с доксициклином. Последующее культивирование проводили на данной среде, на 4 день после индукции клетки переносили на фидерную подложку из митомицин-инактивированных фибробластов. В течении последующих дней наблюдались значительные изменения в морфологии и усиленной пролиферации клеток. Через 2 недели

наблюдали очаги образования колоний клеток, по морфологии напоминающие колонии индуцированных стволовых клеток (Рис. 3 Б, В, Г).

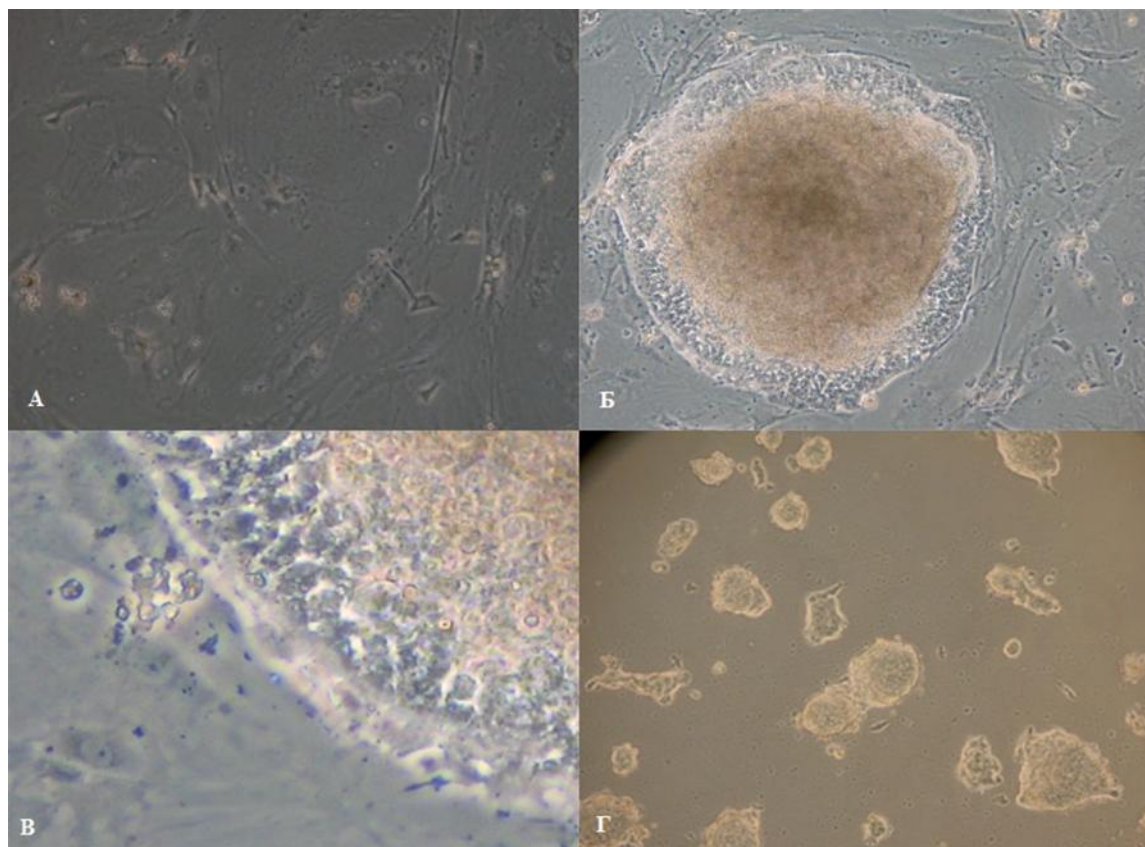


Рисунок 3. А: Культура фибробластов, выделенных из хвостов мышей *Dysf*^{-/-}. Б: Колония клеток, с морфологией характерной для иПС клеток. В: Увеличенное изображение колонии иПС клеток. Г: иПС клетки формируют характерные колонии в культуре, 4й пассаж.

В результате репрограммирования, клетки приобрели характерную округлую форму, объём их ядер и цитоплазмы уменьшился (Рис. 3.В), что также является особенностью эмбриональных стволовых клеток. При дальнейшем культивировании данная колония сохраняет подобную организацию и морфологию (Рис. 3.Г). Каждый клон наращивали последовательно, на этапе переноса клеток в лунку шестилуночного планшета из культуральной среды исключали доксициклин, что не влияло на пролиферацию и морфологию клеток. Дополнительно, иммуофлуоресцентное окрашивание показало, что данные клетки экспрессируют эндогенный Oct4, не зависящий от векторной вирусной кассеты.

3.2. Полученные иПС клетки экспрессируют эндогенной Oct4

Одним из свойств индуцированных стволовых клеток является их способность к нацеленному блокированию ретро- и лентивирусов при помощи ДНК метилирования *de novo*[53]. В то же время, в полностью репрограммированной клетке происходит реактивация эндогенных плюрипотентных генов [54]. Таким образом, после процесса репрограммирования, плюрипотентные клетки активно подавляют экспрессию лентивируса, при этом динамическое равновесие между репрограммирующими факторами поддерживает их конститутивную эндогенную экспрессию в данных клетках.

Чтобы показать, что после репрограммирования зависимость от экзогенной экспрессии Oct4 пропадает и появляется стабильно экспрессирующийся эндогенный Oct4, была проведена иммунофлуоресцентная окраска полученных колоний на данный маркер (Рис. 4), по результатам которого мы отбирали наиболее подходящие клоны. Критериями отбора были: наличие экспрессии Oct4 в максимальном количестве клеток, равномерность экспрессии, морфология клеток и ядер, и относительная скорость пролиферации культивируемых клеток.

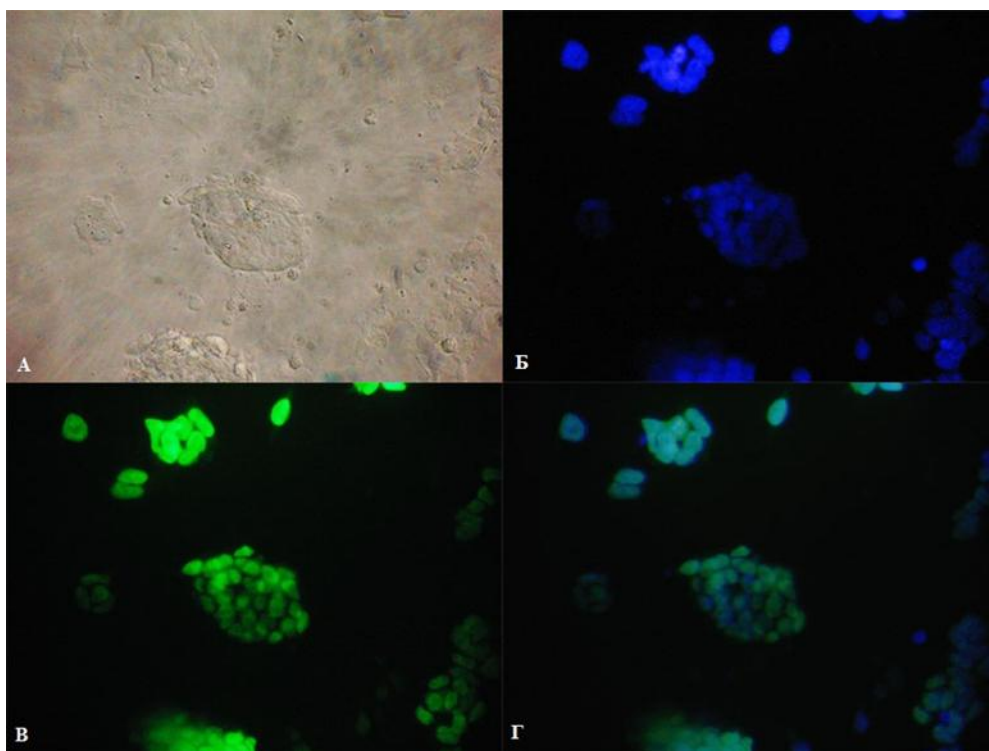


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание иПС клонов на Oct4. А: Фазово-контрастное изображение иПС клонов, Б: Окраска ядер, DAPI (синий), В: Окраска антителами на Oct4, FITC (зеленый), Г: Совмещённое изображение.

Всего было получено 9 стабильно растущих клонов *Dysf^{-/-}* иПС клеток. Все клоны отмечались хорошими ростовыми свойствами, хотя наблюдались незначительные отличия между клонами (Таб. 1). Также, иммуноокрашивание показало, что все клоны на 2-3 пассажах (после исключения доксициклина) экспрессируют эндогенный Oct4 (Таб. 1), Пример окраски на Oct4 клона №7, представленный на рисунке 3, показывает что все клетки в составе клонов экспрессируют высокий уровень эндогенного Oct4. Ядерная локализация Oct4, морфология ядер и клеток схожа с таковой у ЭС клеток. В контроле Oct4 не детектировался в первичных фибробластах (данные не приведены). Мы наблюдали, что клоны с высокими ростовыми свойствами и гомогенностью в морфологии также показывают высокий и гомогенный уровень экспрессии Oct4. Данные клоны были отобраны для дальнейшего анализа (Табл. 1).

Таблица 1. Характеристика полученных $Dysf^{-/-}$ иПС клонов. (н.п. – не проверялось)

иПС клоны $Dysf^{-/-}$ №	Ростовые показатели клонов	Экспрессия Oct4	Интъекции иПС клеток в Nu/J мышей	Образование тератом
1	+++	+	1мышь/4x10 ⁶	++
2	++	+	-	н.п.
3	++	+ гетерогенность	-	н.п.
4	+++	+	1 мышь/3x10 ⁶	-
5	++	+ гетерогенность	-	н.п.
6	++	+ гетерогенность	-	н.п.
7	+++	+	1 мышь/5x10 ⁶	++
8	++	+ гетерогенность	-	н.п.
9	++	+ гетерогенность	-	н.п.

3.3. $Dysf^{-/-}$ иПС клетки формируют тератомы с производными трёх зародышевых листков

Одним из основных свойств плюрипотентных стволовых клеток является способность дифференцироваться в клетки всех трёх типов зародышевых листков (энтодерма, эктодерма, и мезодерма) [55]. Главным методом оценки плюрипотентности репрограммированных клеток является тест на формирование тератом[15]. Для образования тератом были использованы иммунодефицитные мыши линии Nu/J – $Foxn1^{-/-}$ с дефектом развития тимуса. Для инъекций были отобраны наиболее хорошо делящиеся иПС клоны. После введения суспензии полученных клеток под кожу иммунодефицитным мышам, приблизительно на 30-й день мы наблюдали заметные опухолевые образования. Дальнейший гистологический анализ опухолей проводился при помощи окрашивания гематоксилином и эозином с последующим поиском на срезах характерных структур, свойственным тканям эктодермы, мезодермы и энтодермы.

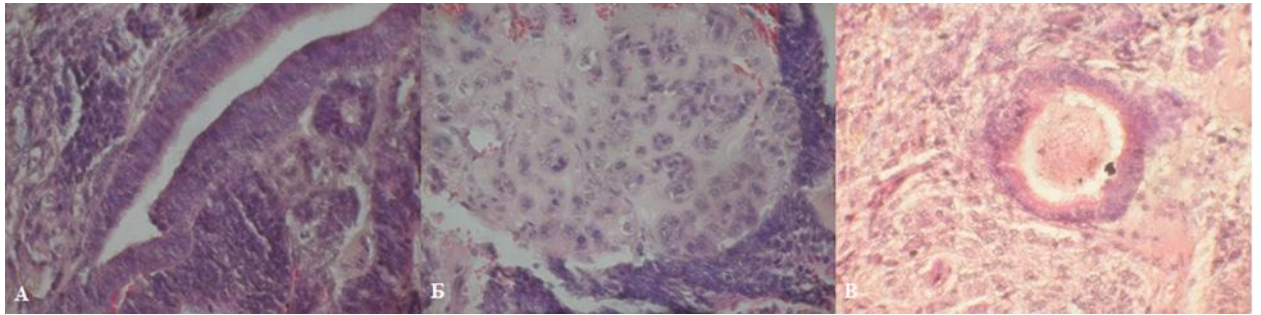


Рисунок 5. Гистологический анализ срезов тератом иПС клона №7. А: Пример эктодермального зачатка – нервная трубка, Б: мезодермальная ткань формирует хрящ, В: энтодермальная ткань представлена реснитчатым эпителием.

Из 3 проанализированных нами иПС клонов только 2 были способны развиться в тератомные опухоли (Таб.1). Данные гистологического анализа подтверждают способность полученных клонов давать начало клеткам всех трёх типов зародышевых листков, что говорит о плюрипотентном статусе полученных иПС клонов (Рис.5). При первоначальной окраске, наблюдались по большей части мезодермальные образования (хрящ – гематоксилин-окрашивающиеся, редко расположенные клетки с характерным матриксом вокруг, а также мышечные волокна), но при дальнейшей порезке и окраске, в других участках тератомы были найдены структуры, напоминающие нервные трубки (сильно гематоксилин-положительные плотные трубки при продольном срезе, или же розетки, при поперечном), относящиеся к эктодерме, и энтодермальный эпителий, с характерной реснитчатой структурой. иПС клетки можно разделить на три типа: полностью репрограммированные – способные к самоподдержанию и дифференцировке во все типы клеток, частично репрограммированные – способные к самоподдержанию и дифференцируемые в ряд типов клеток, и aberrantly репрограммированные, которые также способны к самоподдержанию, но трудно поддаются дифференцировке [56]. В нашем случае, анализ плюрипотентности полученных $Dysf^{-/-}$ иПС клонов доказывает их полное репрограммирование, что критически важно для их

дальнейшего применения как клеток реципиентов искусственных хромосом, несущих рекомбинантный ген дисферлина, в данной генотерапевтической модели.

3.4. Независимое положения искусственной хромосомы, несущей рекомбинантный ген *Dysf*, в СНО клетках

Одним из основных свойств искусственных хромосом человека (ИХЧ), благодаря наличию функциональной центромеры, является способность к долгосрочному поддержанию, как однокопийной эписомы, без интеграции в хромосомы клетки-хозяина. Для подтверждения наличия и правильного расположения ИХЧ, была проведена FISH (fluorescence in situ hybridization) гибридизация препарата метафазных пластинок СНО клеток с зондами, специфичными к последовательности искусственной хромосомы (Рис. 6).

FISH анализ представляет из себя метод, направленный на определение положения отдельных хромосом или на поиск и подтверждение наличия определённых нуклеотидных последовательностей в составе хромосом. Идея метода заключается в гибридизации хромосомной ДНК с целевыми нуклеотидными последовательностями, конъюгированными или с биотином, или с диоксигенином, или с определёнными флуорохромами.

В нашем случае, гибридизацию проводили с олигонуклеотидами, представляющими собой разные участки хромосомы, меченными двумя разными флуорохромами. Для детекции самой хромосомы использовали олигонуклеотидные пробы альфа-сателлитной ДНК, меченные Alexa546 флуорофором (эмиссия в красной части спектра), в свою очередь, чтобы видеть наличие целевого гена в составе хромосомы, использовали олигонуклеотиды вектора содержащего последовательность дисферлина, меченного Alexa488 флуорофором с областью эмиссии в зеленой части спектра.

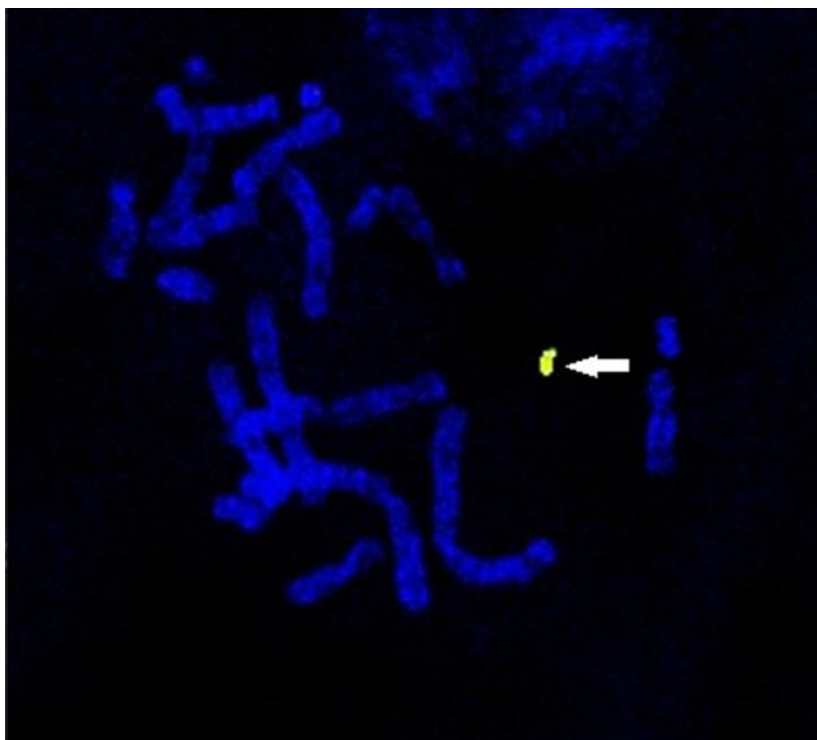


Рисунок 6. FISH анализ СНО клеток, содержащих ИХЧ-Dysf. Совмещённое изображение сигнала после гибридизации на альфа-сателлитную ДНК ИХЧ, Alexa546 (красный) и сигнала на целевую вставку последовательности дисферлина, Alexa488 (зеленый).

FISH гибридизация выявила колокализацию сигналов целевых и общих последовательностей ИХЧ-Dysf хромосомы, и ее независимое положение вне хромосом СНО донорных клеток (Рис. 6), таким образом наш анализ показал, что в процессе сборки данной ИХЧ-Dysf хромосомы, она не интегрировалась в геном клетки хозяина, что позволяет использовать ее для переноса в реципиентные, $Dysf^{-/-}$ иПС клетки.

3.5. Подтверждение экспрессии экзогенного дисферлина в донорных СНО клетках

Для того, чтобы подтвердить наличие экспрессии экзогенного дисферлина в донорных СНО клетках, содержащих ИХЧ-Dysf мы проводили иммуноблоттинг (Рис. 6). Иммуно- или вестерн-блоттинг представляет собой один из широко используемых иммунохимических методов, который позволяет определять относительное количество определенного белка в биологических

образцах. В данном методе белки разделяются с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, и после переноса на нитроцеллюлозную мембрану белки интереса выявляются иммунохимически с помощью специфичных антител. Разработанной в нашей лаборатории генетической конструкции ИХЧ-Dysf, экспрессия дисферлина контролируется конститутивным промотором и особым инсулятором, которые должны эффективно экспрессировать данный белок в любых типах клеток[57].

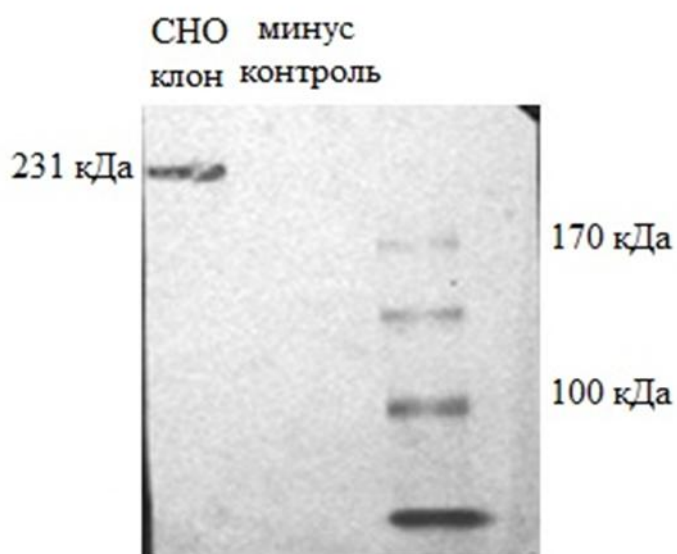


Рисунок 7. Иммуноблоттинг-анализ экспрессии белка дисферлина (молекулярная масса 231 кДа) в конструкции ИХЧ-Dysf СНО клеток. Справа указаны значения молекулярных масс (кДа) белковых маркеров.

Иммуноблоттинг клеточного лизата ИХЧ-Dysf СНО клона показал наличие экспрессии экзогенного дисферлина. Так, на блоте видна отчетливая полоса соответствующая молекулярной массе данного белка (231 килодальтонов, кДа) (Рис. 7). В контрольном клеточном лизате родительских СНО, не содержащих данной ИХЧ, экспрессия данного белка отсутствует (Рис. 7). Таким образом наши данные говорят, что сконструированная ИХЧ-Dysf функционируют корректно, экспрессирует полноразмерный рекомбинантный дисферлин, и может быть использована для ее переноса в полученные иПС клетки мыши.

3.6. Обсуждение

В настоящее время различные генотерапевтические модели успешно применяются для терапии некоторых видов дистрофийных заболеваний. Недавние работы в моделировании терапии дистрофии Дюшена мышцей показали использование ИХЧ для переноса полноценного гена дистрофина в мезоангиобласты или клетки предшественники мышечной ткани, дефектные по данному гену. У этих мышечных, которым вводятся модифицированные таким образом мезоангиобласты, наблюдается заметное улучшение состояния и мышечной подвижности в течении продолжительного времени[58]. В отличие от вышеизложенной модели мы используем индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и $\text{alphoid}^{\text{tetO}}$ -НАС искусственные хромосомы. Одним из главных достоинств таких искусственных хромосом в сравнении с ИХЧ, синтезируемой «сверху-вниз» способом, является их способность к элиминированию и отсутствие больших скрытых последовательностей. Также, использование плюрипотентных стволовых клеток, вместо дифференцированных предшественников, расширяет границы использования ИХЧ-технологии. В свою очередь разработка новых конструкций и типов донорных клеток требует дальнейших исследований.

Наши исследования показали, что не смотря на относительно низкую эффективность репрограммирования, свойственной используемым современным методам, были получены полноценные иПС клетки из $\text{Dysf}^{-/-}$ мышечных. Также получены данные о том, что недавно разработанная искусственная хромосома способна полноценно поддерживать себя в реципиентных клетках, и стабильно экспрессировать целевой рекомбинантный белок. В дальнейшем будет необходимо показать, что искусственная хромосома может поддерживать себя и экспрессировать трансген в полученных иПС клетках. Исследования активности данных ИХЧ в самоподдержании и эффективности экспрессии целевых продуктов позволит оценить их для дальнейшего использования в аналогичных генотерапевтических моделях. Кроме изложенной в данной работе перспективы использования ИХЧ-генной

терапии для лечения дисферлинопатий, ИХЧ-технология в комплексе с использованием иПС клеток, имеет ряд других потенциальных приложений. Таких как исследования в области хромосомных нестабильностей, функционирования кинетохор, генерации иПС клеток, лечения рака, и разработка противораковых препаратов [39]. Использование ИХЧ-технологии в генерации иПС клеток особенно перспективно, так как благодаря способности искусственной хромосомы к самоликвидации, за счёт tetO участков, становится возможным получение иПС клеток, полностью лишённых каких-либо остаточных продуктов.

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Получены плюрипотентные стволовые клетки из первичных фибробластов мутантных по гену дисферлина мышей (Dysf^{-/-}), используя индуцибельную лентивирусную систему экспрессии факторов репрограммирования.

2. Полученные клоны иПС клеток экспрессируют эндогенный фактор Oct4, и способны развиваться в ткани всех зародышевых листков, что свидетельствует о их полном репрограммировании и плюрипотентности.

3. Показано, что ранее сконструированная искусственная хромосома, несущая рекомбинантный дисферлин, не интегрирована в геном донорных СНО клеток, стабильно экспрессирует целевой белок и может быть использована для переноса в полученные иПС клетки.

Список используемых источников

1. Ramalho-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term "stem cell" // Cell Stem Cell. – 2007. – V. 1. – N. 1. – P. 35-38;
2. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research // Nature reviews. Genetics. – 2006. – V. 7. – N. 4. – P. 319-327;
3. Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. // Nature reviews. Molecular cell biology. – 2011. – V. 12 – N. 10. – P. 680-686.
4. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. – 1981. – V. 292. – N. 5819. – P. 154-156.
5. Gruen L., Grabel L. Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy // Stem Cells. – 2006. – V. 24. – N. 10. – P. 2162-2169.
6. Yamanaka S., Blau H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches // Nature. – 2010. – V. 465 – N. 7299. – P. 704-712.
7. Gurdon J.B., Byrne J.A., Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – V. 100. – Suppl. 1. – P. 11819-11822.
8. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy // The New England journal of medicine. – 2003. – V. 349. – N. 3. – P. 275-286.
9. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // Cell. – 2008. – V. 132. – N. 4. – P. 567-582.
10. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // Science. – 2005. – V. 309. – N. 5739. – P. 1369-1373.

11. Hasegawa K1, Zhang P, Wei Z, Pomeroy JE, Lu W, Pera MF. Comparison of reprogramming efficiency between transduction of reprogramming factors, cell-cell fusion, and cytoplasm fusion // *Stem cells*. – 2010. – V. 28. – N. 8. – P. 1338-1348.
12. Graf T. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming // *Cell stem cell*. – 2011. – V. 9. – N. 6. – P. 504-516.
13. Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts // *Cell*. – 1987. – V. 51. – N. 6. – P. 987-1000.
14. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications // *Genes & development*. – 2010. – V. 24. – N. 20. – P. 2239-2263
15. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. – 2006. – V. 126. – N. 4. – P. 663-676.
16. González F., Boué S., Izpisua Belmonte J.C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte // *Nature reviews. Genetics*. – 2011. – V. 12. – N. 4. – P. 231-242.
17. Shao L., Wu W.S. Gene-delivery systems for iPS cell generation // *Expert opinion on biological therapy*. – 2010. – V. 10. – N. 2. – P. 231-242.
18. Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – N. 1. – P. 157-162.
19. Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., Mansour A.A., Caspi I., Krupalnik V., Zerbib M., Maza I., Mor N., Baran D., Weinberger L., Jaitin D.A., Lara-Astiaso D., Blecher-Gonen R., Shipony Z., Mukamel Z.,

- Hagai T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Tanay A., Amit I., Novershtern N., Hanna J.H. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency // *Nature*. – 2013. – V. 502. – N. 7469. – P. 65-70.
20. Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors // *Science*. – 2002. – V. 295. – N. 5556. – P. 868- 872.
21. Pardo M., Lang B., Yu L., Prosser H., Bradley A., Babu M.M., Choudhary J. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease // *Cell stem cell*. – 2010. – V. 6. – N. 4. – P. 382-395.
22. Jerabek S., Merino F., Schöler H.R., Cojocaru V. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency // *Biochimica et biophysica acta*. – 2014. – V. 1839. – N. 3. – P. 138-154.
23. Zaret K.S., Carroll J.S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression // *Genes & development*. – 2011. – V. 25. – N. 21. – P. 2227-2241.
24. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3 // *Genes & development*. – 1995. – V. 9. – N. 21. – P. 2635-2645.
25. Boiani M., Schöler H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2005. – V. 6. – N. 11. – P. 872-884.
26. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells // *Nature cell biology*. – 2007. – V. 9. – N. 6. – P. 625-635.

27. Zhang P., Andrianakos R., Yang Y., Liu C., Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – V. 285. – N. 12. – P. 9180-9189.
28. Dang C.V., O'Donnell K.A., Zeller K.I., Nguyen T., Osthus R.C., Li F. The c-Myc target gene network // *Seminars in cancer biology*. – 2006. – V. 16. – N. 4. – P. 253-264.
29. Kim J., Chu J., Shen X., Wang J., Orkin S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells // *Cell*. – 2008. – V. 132. – N. 6. – P. 1049-1061.
30. Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts // *Cell stem cell*. – 2008. – V. 2. – N. 1. – P. 10-12.
31. Gardlík R., Pálffy R., Hodosy J., Lukács J., Turna J., Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. – 2005. – V. 11. – N. 4. – P. 110-121.
32. Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies // *Nature reviews. Genetics*. – 2011. – V. 12. – N. 5. – P. 301-315.
33. Mingozzi F., High K.A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges // *Nature reviews. Genetics*. – 2011. – V. 12. – N. 5. – P. 341-355.
34. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems // *International journal of pharmaceutics*. – 2014. – V. 459. – N. 1-2. – P. 70-83.

35. Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution // The Journal of the Association of Physicians of India. – 2013. – V. 61. – N. 2. – P. 127-133.
36. Ginn S.L., Alexander I.E., Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update // The journal of gene medicine. – 2013. – V. 15. – N. 2. – P. 65-77.
37. Wang T., Upponi J.R., Torchilin V.P. Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies // International journal of pharmaceutics. – 2012. – V. 427. – N. 1. – P. 3-20.
38. Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy // Nature reviews. Genetics. – 2014. – V. 15. – N. 8. – P. 541-555.
39. Kouprina N., Tomilin A.N., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V. Human artificial chromosome-based gene delivery vectors for biomedicine and biotechnology // Expert opinion on drug delivery. – 2014. – V. 11. – N. 4. – P. 517-535.
40. Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Abe S., Iida Y., Osaki M., Katoh M., Hiratsuka M., Shirayoshi Y., Hiramatsu K., Ueno E., Kajitani N., Yoshino T., Kazuki K., Ishihara C., Takehara S., Tsuji S., Ejima F., Toyoda A., Sakaki Y., Larionov V., Kouprina N., Oshimura M. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis // Gene therapy. – 2011. – V. 18. – N. 4. – P. 384-393.
41. Kouprina N., Larionov V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution // Nature reviews. Genetics. – 2006. – V. 7. – N. 10. – P. 805-812.
42. Kouprina N., Earnshaw W.C., Masumoto H., Larionov V. A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy //

Cellular and molecular life sciences : CMLS. – 2013. – V. 70. – N. 7. – P. 1135-1148.

43. Ohzeki J., Larionov V., Earnshaw W.C., Masumoto H. Genetic and epigenetic regulation of centromeres: a look at HAC formation // *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.* – 2015. – V. 23. – N. 1. – P. 87-103.
44. Oshimura M., Uno N., Kazuki Y., Katoh M., Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges // *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.* – 2015. – V. 23. – N. 1. – P. 111-133.
45. Meaburn K.J., Parris C.N., Bridger J.M. The manipulation of chromosomes by mankind: the uses of microcell-mediated chromosome transfer // *Chromosoma.* – 2005. – V. 114. – N. 4. – P. 263-274.
46. Tedesco F.S. Human artificial chromosomes for Duchenne muscular dystrophy and beyond: challenges and hopes // *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.* – 2015. – V. 23. – N. 1. – P. 135-141.
47. Amato A.A., Griggs R.C. Muscular Dystrophies. Handbook of Clinical Neurology. – V. 101. – Ch. 1. – Elsevier. – 2011.
48. Glover L., Brown R.H. Jr. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair // *Traffic.* – 2007. – V. 8. – N. 7. – P. 785-794
49. Bansal D., Campbell K.P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy // *Trends in cell biology.* – 2004. – V. 14. – N. 4. – P. 206-213.

50. Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy // Skeletal muscle. – 2011. – V. 1. – N. 1. – P. 10.
51. Amato A.A., Griggs R.C. Muscular Dystrophies. Handbook of Clinical Neurology. – V. 101. – Ch. 7. – Elsevier. – 2011.
52. Barthélémy F., Wein N., Krahn M., Lévy N., Bartoli M. Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies // Molecular medicine. – 2011. – V. 17. – N. 9-10. – P. 875-882.
53. Hotta A., Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states // Journal of cellular biochemistry. – V. 105. – N. 4. – P. 940-948.
54. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D.T., Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse // Cell stem cell. – 2008. – V. 2. – N. 3. – P. 230-240.
55. Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1981. – V. 78. – N. 12. – P. 7634-7638.
56. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells // Cell. – 2009. – V. 137. – N. 1. – P. 13-17.
57. Liskovykh M., Ponomartsev S., Popova E., Bader M., Kouprina N., Larionov., Alenina N., Tomilin A. Stable maintenance of de novo assembled human artificial chromosomes in embryonic stem cells and their differentiated progeny in mice // Cell Cycle. – 2015. – V. 14. – N. 8. – P. 1268-1273
58. Tedesco F.S., Hoshiya H., D'Antona G., Gerli M.F., Messina G., Antonini S., Tonlorenzi R., Benedetti S., Berghella L., Torrente Y., Kazuki Y., Bottinelli R., Oshimura M., Cossu G. Stem cell-mediated transfer of a human artificial

chromosome ameliorates muscular dystrophy // Science translational medicine.
– 2011. – V. 3. – N. 96.