

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623799>

Создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения функций гена *UBE2A*

А.В. Федоренко^{1,2}, Е.А. Хомякова¹, А.В. Сурдина¹, Е.К. Секретова¹, Т.В. Лиманская¹, Л.Д. Беликова^{1,3}, Е.А. Воловиков^{1,3}, М.М. Гридина⁴, А.А. Хабарова⁴, А.А. Кашеварова³, Д.А. Федотов³, Е.А. Зеркаленкова⁵, М.А. Лагарькова¹, И.Н. Лебедев³, А.Н. Богомазова^{1,3}

¹ Федеральное научно-клиническое учреждение здравоохранения «Федеральный научный центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия;

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия;

³ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия;

⁴ Федеральное исследовательское учреждение «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Белок UBE2A относится к семейству E2 убиквитин-связывающих ферментов, которые участвуют в процессе убиквитинирования белков-субстратов. Известно, что мутации гена *UBE2A* связаны с синдромом врожденной X-сцепленной умственной отсталости типа Насименто. До сих пор остаётся неизвестным, каким образом дисфункция гена *UBE2A* приводит к нарушению развития центральной нервной системы.

Цель исследования — создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для изучения молекулярных и клеточных функций гена *UBE2A* в нейрогенезе.

Методы. Используя геномное CRISPR-Cas9-редактирование и лентивирусную трансдукцию, мы создали клеточную модель на основе ИПСК двух здоровых доноров, включающую изогенные ИПСК с нокаутом и индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A*. Дополнительно к изогенным системам мы получили линию ИПСК путём репрограммирования мононуклеаров периферической крови пациента, которому поставлен диагноз X-сцепленной умственной отсталости типа Насименто и у которого выявлена делеция, целиком захватывающая локус гена *UBE2A*.

Результаты. Полученные ИПСК демонстрируют морфологию, подобную эмбриональным стволовым клеткам. Они экспрессируют маркёры плюрипотентных клеток OCT4, SOX2, SSEA-4 и TRA-1-81 и имеют нормальный кариотип. Обнаружено, что у ИПСК с нокаутом или гиперэкспрессией гена *UBE2A* происходит статистически значимое увеличение размера клеточного ядра по сравнению с изогенным контролем.

Заключение. Созданная клеточная модель на основе ИПСК может быть использована для фундаментальных исследований функций гена *UBE2A* в нейрогенезе.

Ключевые слова: ИПСК; убиквитин-конъюгирующий белок E2A (гомолог Rad6) человека; X-сцепленная умственная отсталость; нокаут гена.

Как цитировать:

Федоренко А.В., Хомякова Е.А., Сурдина А.В., Секретова Е.К., Лиманская Т.В., Беликова Л.Д., Воловиков Е.А., Гридина М.М., Хабарова А.А., Кашеварова А.А., Федотов Д.А., Зеркаленкова Е.А., Лагарькова М.А., Лебедев И.Н., Богомазова А.Н. Создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения функций гена *UBE2A* // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 2. С. 297–313. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623799>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623799>

Design of iPSC-based cell model to study the functions of the *UBE2A* gene

Alisa V. Fedorenko^{1,2}, Ekaterina A. Khomyakova¹, Anastasia V. Surdina¹, Elizaveta K. Sekretova¹, Tatiana V. Limanskaya¹, Lilia D. Belikova^{1,3}, Egor A. Volovikov^{1,3}, Maria M. Gridina⁴, Anna A. Khabarova⁴, Anna A. Kashevarova³, Dmitry A. Fedotov³, Elena A. Zerkalenkova⁵, Maria A. Lagarkova¹, Igor N. Lebedev³, Alexandra N. Bogomazova^{1,3}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia;

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia;

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

⁴ The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia;

⁵ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The *UBE2A* protein belongs to the E2 family of ubiquitin-binding enzymes involved in the ubiquitination of substrate proteins. *UBE2A* mutations lead to congenital X-linked mental retardation syndrome-type Nascimento. How *UBE2A* participates in the central nervous system development is still unknown.

AIM: To establish a cell model based on induced pluripotent stem cells (iPSCs) to study the molecular and cellular functions of *UBE2A* in neurogenesis.

METHODS: Using genomic CRISPR-Cas9 editing and lentiviral transduction, a cell model based on iPSCs from two healthy donors was designed. This cell model includes isogenic iPSCs with knockout and inducible hyperexpression of *UBE2A*. In addition, iPSCs were obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient diagnosed with X-linked mental retardation of Nascimento type, which has a deletion spanning the whole *UBE2A* locus.

RESULTS: The obtained iPSCs demonstrate an ESC-like morphology. They express pluripotent cell markers OCT4, SOX2, SSEA-4, and TRA-1-81 and have normal karyotypes. iPSCs with *UBE2A* knockout or hyperexpression had significantly increased nuclei size compared with the isogenic control.

CONCLUSION: The developed iPSC-based cell model can be used for fundamental studies of the functions of *UBE2A* in neurogenesis.

Keywords: iPSC; ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog), human; X-linked mental retardation; gene knockout.

To cite this article:

Fedorenko AV, Khomyakova EA, Surdina AV, Sekretova EK, Limanskaya TV, Belikova LD, Volovikov EA, Gridina MM, Khabarova AA, Kashevarova AA, Fedotov DA, Zerkalenkova EA, Lagarkova MA, Lebedev IN, Bogomazova AN. Design of iPSC-based cell model to study the functions of the *UBE2A* gene. *Genes & cells*. 2024;19(2):297–313. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623799>

Received: 24.11.2023

Accepted: 10.04.2024

Published online: 05.06.2024

ВВЕДЕНИЕ

Белок UBE2A, кодируемый одноимённым X-сцепленным геном, относится к семейству E2 убиквитин-связывающих ферментов и участвует в процессе убиквитинирования — присоединения короткого полипептида убиквитина к белкам-субстратам. В процессе переноса убиквитина на белковые субстраты UBE2A взаимодействует с разными E3-убиквитинлигазами, с каждой из которых он участвует в различных клеточных процессах. Например, при митофагии белок UBE2A взаимодействует с убиквитинлигазой PARKIN [1], при регуляции транскрипции через моноубиквитинирование гистона H2B — с убиквитинлигазой RNF20/RNF40 [2], а при репарации путём синтеза ДНК через повреждение — с убиквитинлигазой RAD18 [3]. В 2023 году также было показано, что UBE2A взаимодействует с нейроспецифичной убиквитинлигазой UBR4 [4].

Белок UBE2A очень консервативен, его последовательность длиной 152 аминокислотных остатка идентична у человека, мыши и шпорцевой лягушки, а у дрожжей имеется его очень близкий гомолог — белок Rad6. Несмотря на консервативность, косвенно свидетельствующую о функциональной важности белка UBE2A, его отсутствие не является летальным. Делеции и мутации в гене *UBE2A* приводят к развитию синдрома Насименто — X-сцепленной умственной отсталости, проявляющейся задержкой психического развития и нарушением интеллекта у носителей [5, 6]. Данное заболевание развивается крайне редко; согласно базе данных VarSome, описано не более трёх десятков случаев умственной отсталости, связанной с мутациями в этом гене [7]. Известно также, что у матерей пациентов с синдромом Насименто, являющихся носительницами патогенных мутаций в гене *UBE2A*, в соматических клетках наблюдается сдвиг от случайной инактивации X-хромосом к полностью неслучайной инактивации конкретной X-хромосомы [6, 8].

Интересно, что база данных VarSome содержит сведения также о дупликациях локуса, включающего ген *UBE2A*. Часть описанных у пациентов дупликаций связана с умственной отсталостью, т.е. нельзя исключить также патогенное влияние увеличенной дозы гена *UBE2A*.

Пока неизвестно, как именно белок UBE2A участвует в процессе формирования центральной нервной системы. Сложность изучения роли этого белка в нейрогенезе заключается, в частности, во множественности его партнёров среди E3-убиквитинлигаз и разнообразии клеточных процессов, в которых он участвует. Кроме того, изучение белка UBE2A затрудняется тем, что в клетках млекопитающих существует гомолог гена *UBE2A* — ген *UBE2B*, расположенный на хромосоме 5. Аминокислотные последовательности белков, кодируемых генами *UBE2A* и *UBE2B*, у человека обладают 96% идентичностью [9]. Сходство последовательностей вызывает немало вопросов о сходстве их функциональной активности, однако следует отметить,

что соотношение продуктов этих генов в разных органах и тканях неодинаково [5], более того, мутации в данных генах приводят к неодинаковым фенотипическим проявлениям [10].

Для изучения молекулярных механизмов наследственных заболеваний *in vitro* во множестве современных исследований используют клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Одним из преимуществ ИПСК является то, что они могут быть получены из клеток пациентов с точно установленным диагнозом [11]. Кроме того, благодаря технологии геномного (например, CRISPR-Cas9) редактирования можно создавать изогенные линии ИПСК, отличающиеся только по определённой мутации, что позволяет исключить влияние генетического фона. ИПСК способны к дифференцировке в различные типы клеток, в том числе и в нейральные клетки. Их также можно применять для получения трёхмерных клеточных структур — органоидов, включая мозговые органоиды [12]. Таким образом, ИПСК могут быть использованы для изучения патологий развития не только на клеточном, но и на тканевом уровне [13]. В частности, ИПСК пациентов с врождёнными заболеваниями развития головного мозга могут быть дифференцированы в интересующий тип нейральных клеток (например, нейроны переднего мозга) для последующего исследования молекулярных патогенетических механизмов [14].

В этой работе мы описываем две независимые изогенные клеточные системы ИПСК, включающие ИПСК с нокаутом и индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A*, созданные нами из ИПСК здоровых доноров при помощи геномного CRISPR-Cas9-редактирования и лентивирусной трансдукции соответственно. В дополнение к изогенным клеточным системам мы получили линию ИПСК из лимфоцитов периферической крови пациента с синдромом Насименто и делецией 167 тыс. п.о. длинного плеча X-хромосомы, которая захватывает 5 генов, в том числе и ген *UBE2A* [8].

Цель исследования — создание клеточной модели на основе ИПСК, предназначенной для изучения молекулярных и клеточных функций гена *UBE2A* в нейрогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования клеток

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки культивировали в среде mTeSR1 (STEMCELL Technologies, Канада) с 50 ед./мл пенициллина-стрептомицина («Пан-Эко», Россия) на покрытых Матригелем (Corning, США) чашках Петри при 37 °C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и влажности 80%. Пассирование клеток проводили с использованием 0,05% трипсина-ЭДТА (Gibco, США) и 10 мкМ ROCK-ингибитора Y27632 (Miltenyi Biotec, Германия). Спонтанную дифференцировку ИПСК выполняли

через стадию формирования эмбрионных тел, как описано ранее [15].

Клетки HEK 293 и HEK 293 Phoenix культивировали в среде DMEM (Gibco), обогащённой 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, *англ.* fetal bovine serum) (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мМ глутамин («ПанЭко»), 50 ед./мл пенициллина-стрептомицина, при 37 °C и 5% CO₂. Смену среды проводили каждые 72 ч. Клетки пассировали с использованием 0,05% трипсина-ЭДТА.

Отсутствие контаминации микоплазмой клеточных культур подтверждали при помощи ПЦР, как описано в [16].

Геномное CRISPR-Cas9-редактирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Для подбора направляющей РНК (нРНК), комплементарной участку второго экзона гена *UBE2A*, был использован онлайн-ресурс CRISPOR [17]. Олигонуклеотиды, кодирующие нРНК (табл. 1), были клонированы в плазмиду PX458 (Addgene, № 48138), несущую гены, которые кодируют нуклеазу Cas9 и зелёный флуоресцентный белок (GFP, *англ.* green fluorescent protein). Трансфекцию проводили с помощью реагента TransIT-LT1 (Mirus Bio,

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Table 1. Oligonucleotides used in the study

Роль	Ген/локус	Размер продукта, п.н.	Прямой/обратный праймер (5'-3')
Референсный ген (ОТ-ПЦР)	<i>GAPDH</i>	118	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA/GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC
	<i>SOX2</i>	278	AACCAGCGCATGGACAGTTAGA/CTTGACCACCGAACCCAT
	<i>SALL4</i>	303	TGGCGGAGAGGGCAAATAACAT/GCTGAAGAACTCCGCACA
	<i>OCT4</i>	887	CCTTCGCAAGCCCTCATTTCCGCA/AGTTTGAGCATCCCTCGC
Маркёры плюрипотентности	<i>DPPA5</i>	331	AAGATGGGAACCTCTCCCCGG/CGCAAGTTTGAGCATCCCTCGC
	<i>LIN28</i>	92	TTCGGCTTCTGTCCATGAC/CCTTCCATGTGCAGCTTACTC
	<i>SALL4</i>	183	GTGCTTCCAGAGCCCTTT/AACCTTGACATAGGTCGGCG
	<i>TDGF1</i>	98	GCTGCTTCTCAGGCATT/ACGTGCAGACGGTGGTAGTT
Детекция микоплазмы	16S рPHK	705–708	ACTCTACGGGAGGCAGCAGTA/TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
Для синтеза направляющей РНК	<i>UBE2A</i>	—	CACCGTCTCCAGCCGGAGTCA/GCGAAACCCTGACTCCGGCTGGAGGAC
Для секвенирования по Сэнгеру	<i>UBE2A</i>	523	CGACCCTCGACTTCGGAGAAAC/ATTTTCCCTACCCGCT
Для переноса CDS гена <i>UBE2A</i>	CDS <i>UBE2A</i>	452–459	ATGTCCACCCCGGCTCGG/TCAACAATCACGCCAGCTTTGTTCTACTA
Для анализа количественной ОТ-ПЦР	мPHK <i>UBE2A</i>	100	GACTTCAAGAGGTTGCAGG/CTTCAGGCCCGAAAATGA
Для анализа интеграции транс-активатора	FUdelta-rtTA	133	AACGCACTGTACGCTCTGTC/CCGCTTTCGCACTTTAGCTG
	pCE-OCT4	106	CCCTGTCTGTCACTACTC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	pCE-KLF4	131	ATGCGACCGAGCATTTTCC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	pCE-SOX2	107	CATGTCCCAGCACTACCAGAG/ TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT
	pCE-LIN28	113	AGAAATCCACAGCCCTACCC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	pCE-L-MYC	122	GGCTGAGAAGAGGATGGCTAC/ TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT
	pCE-mp53DD	236	CGTAAACGCTTCGAGATGTTCC/ CACACCAGCCACCACCTTC
	<i>EBNA1</i>	122	CGGGGTAGAGGACGTGAAAG/ GGAGACCCGGATGATGATGAC
	<i>VPS4A</i>	98	GGCAACCACTGCTAATCTACTT/ GCCACAAAGGACCACCTATT
	<i>HEXB</i>	136	CCGGGCACAATAGTTGAAGT/ TCCTCCAATCTGTCCATAGC
Верификация делеции	<i>UBE2A</i>	92	CAAAAGCTGGCGTGATTGTTG/ GGAGTAGGGAGGTGACAAACA
	<i>SEPTIN6</i>	112	GACACCCTGTTCAACACCAAA/ GCTTTAGCCTCACGTTGCTC
Потенциальные нецелевые эффекты редактирования	<i>SNX11</i>	114	TGGAAAGTCCCACTCTCCCA/CATGATCTCTCCACAGCC

Примечание: ОТ-ПЦР — ПЦР с обратной транскрипцией, CDS — вирус с кодирующей последовательностью.

Note: ОТ-ПЦР — reverse transcription polymerase chain reaction, CDS — coding sequence.

США) по протоколу производителя. GFP-положительные клетки сортировали при помощи FACS Melody (BD, США) на второй день после трансфекции и высевали при низкой плотности в среду mTeSR1 с 10 мкМ ROCK-ингибитора Y27632 и CloneR (STEMCELL Technologies). Спустя 10 дней ИПСК высевали в индивидуальные лунки 48-луночного планшета (Corning).

Из отобранных клонов ИПСК была выделена ДНК с помощью набора «М-сорб» («Синтол», Россия) по протоколу производителя. Для оценки результатов геномного редактирования проведено секвенирование по Сэнгеру. Потенциальные нецелевые сайты CRISPR-Cas9-редактирования генома выбирали с помощью онлайн-ресурса Off-Spotter [18]. Затем выполняли ПЦР с праймерами (см. табл. 1), охватывающими потенциальные нецелевые сайты редактирования, полученные ампликоны секвенировали по Сэнгеру.

Лентивирусная трансдукция индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Для получения лентивирусов использовали вирус с трансаактиватором системы tet-ON (Addgene, кат. № 43915), вирус с кодирующей последовательностью (CDS, *англ.* coding sequence) гена *UBE2A*, вирус с GFP LeGO-G2 (Addgene, № 25917). Вирус с CDS гена *UBE2A* был получен с помощью переноса CDS гена *UBE2A* из плазмиды pDEST17-Ube2A (Addgene, кат. № 15780) в плазмиду pFU-tet-o-hSox2 (Addgene, кат. № 19779). Клетки HEK 293 Phoenix трансфицировали вспомогательными плазмидами, содержащими вирусные гены *Rev*, *RRE*, *VSV-G*, и целевой плазмидой в соотношении 19:37:7:37% соответственно при помощи Унифектина-56 по протоколу производителя (ИБХ РАН, Россия). Сбор супернатанта с вирусными частицами производили через 48 и 72 ч. Супернатант фильтровали через фильтр 0,45 мкм. Для подсчёта титра лентивирусов клетки инфицировали супернатантом с вирусом, несущим ген *GFP*, в различных разведениях (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625). Титр подсчитывали, определяя процент GFP-положительных клеток.

За день до трансдукции ИПСК высевали на 12-луночный планшет (Corning) в плотности 40 тыс./см². Клетки трансдуцировали двумя лентивирусами: с трансаактиватором системы tet-ON и с CDS гена *UBE2A*. MOI (*англ.* multiplicity of infection) обоих вирусов была равна 10. Через 48 ч клетки рассеивали в низкой плотности. Спустя 10 дней отбирали клоны ИПСК. Наличие вставки целевых плазмид в геноме подтверждено с помощью ПЦР с использованием двух пар праймеров: на фрагмент CDS гена *UBE2A* и на фрагмент кассеты системы tet-ON (см. табл. 1).

Репрограммирование лимфоцитов

После получения информированного согласия представителя пациента с синдромом Насименто произведён забор крови. Репрограммирование лимфоцитов

периферической крови выполняли, как было описано ранее [19, 20]. Всего в 500 тыс. мононуклеарных клеток периферической крови методом электропорации с помощью Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) было внесено 5 неинтегрируемых эписом (Addgene, № 41813–41814, № 41855–41857), суммарно в количестве 6 мкг. В процессе репрограммирования и получения клонов ИПСК клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 20% заменителя сыворотки Knockout, 1% GlutaMAX-I, 1% заменимых аминокислот, 1% пенициллина-стрептомицина, 0,1 мМ β-меркаптоэтанола и 10 нг/мл рекомбинантного белка bFGF (все реактивы от Thermo Fisher Scientific), на слое фидерных клеток. Отбор полученных клонов ИПСК проводили механически. На 2–5-м пассаже ИПСК переводили в бесфидерные условия: в среду mTeSR1 на чашки, покрытые Матригелем. Проверку на интеграцию эписомных векторов в геном ИПСК проводили на 12–18-м пассаже при помощи количественной ПЦР с праймерами на все внесённые трансгены. Для подтверждения делеции использовали ПЦР в реальном времени с праймерами на гены *UBE2A* и *SEPT6*, локализованные в области делеции, а также с контрольными праймерами на ген *HEXB* (см. табл. 1).

Проточная цитометрия

Суспензию ИПСК получали с использованием 0,05% раствора трипсина-ЭДТА. Для окрашивания поверхностных маркёров SSEA-4 и TRA-1-81 собранные клетки инкубировали с первичными антителами в течение 15 мин при комнатной температуре. При окрашивании ядерного маркёра OCT4 клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин на льду, затем их обрабатывали 80% холодным этанолом в течение 30 мин на льду, потом инкубировали с первично-мечеными антителами (табл. 2) в фосфатно-солевом буфере (PBS) («ПанЭко») с добавлением 2% FBS при 4 °C в течение 60 мин. Для окрашивания на поверхностные маркёры SSEA-4 и TRA-1-81 образцы инкубировали с вторичными антителами (табл. 3) при 4 °C в течение 30 мин в темноте. Анализ проводили с помощью проточного цитометра NovoCyte (Agilent, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида, разведённом на PBS в течение 10 мин, затем проводили пермеабиллизацию в 0,1% Тритоне X-100 (Sigma-Aldrich) в течение 10 мин и инкубировали с блокирующим раствором, состоящим из PBS, 0,1% Tween 20 (Thermo Fisher Scientific), 2,5% FBS, 2,5% сыворотки козы (Thermo Fisher Scientific), в течение 30 мин. Все процедуры выполняли при комнатной температуре. Первичные антитела инкубировали с клетками в течение ночи при 4 °C, вторичные флуоресцентно-меченые антитела инкубировали 30–45 мин при комнатной температуре. Ядра окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich). Препараты анализировали

Таблица 2. Первичные антитела, использованные в работе**Table 2.** Primary antibodies used in the study

Антитело	Производитель, кат. №	RRID
Rabbit IgG anti-OCT4	Abcam, ab18976	RRID:AB_444714
Mouse Alexa Fluor 488 anti-Oct4 (Oct3)	Sony Biotechnology, 3868525	RRID:AB_2940931
Rabbit IgG anti-SOX2	Abcam, ab97959	RRID:AB_2341193
Mouse IgG3 anti-SSEA-4	DSHB, MC-813-70	RRID:AB_528477
Mouse IgM anti-TRA-1-81	Cell Signaling Technology, 4745	RRID:AB_2119060
Mouse IgG2b, kappa anti-Tubulin β 3 (TUBB3)/ Clone: AMC0115	ABclonal, A18132	RRID:AB_2861923
Rabbit IgG anti-human HNF3 β /FOXA2	ABclonal, A19053	RRID:AB_2862546
Rabbit IgG anti-human Vimentin/Clone: SP20	Thermo Fisher, RM-9120-S0	RRID:AB_722371
Mouse IgG1 anti-human cytokeratin PAN (CK PAN)	«ПраймБиоМед», 10-310046	RRID:AB_2940932
Rabbit IgG anti-UBE2A	Thermo Fisher Scientific, PA5-112140	RRID:AB_2866876
Rabbit anti-human TATA binding protein TBP	Abcam, ab63766	RRID:AB_1281140

Таблица 3. Вторичные антитела, использованные в работе**Table 3.** Secondary antibodies used in the study

Антитело	Производитель, кат. №	RRID
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Thermo Fisher Scientific, A21422	RRID:AB_2535844
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific, A21236	RRID:AB_2535805
Rabbit anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	Sigma-Aldrich, A9044	RRID:AB_258431
Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	Sigma-Aldrich, A9169	RRID:AB_258434

на флуоресцентном микроскопе Eclipse Ni-E (Nikon, Япония), оборудованном камерой Qi2 (Nikon), микрофотометрию проводили с использованием программного обеспечения BR NIS-Elements (Nikon).

Вестерн-блоттинг

Для получения белковых лизатов клеточный осадок ресуспендировали в буфере RIPA (50 mM Tris HCl; 150 mM NaCl; 0,5% Sodium deoxycholate; 0,1% SDS), инкубировали в течение часа при 4 °C, далее хранили при температуре –70 °C. Белковые лизаты смешивали с двукратным буфером Лэммли (Bio-Rad, США), инкубировали в течение 5 мин при 95 °C, на лунку геля наносили 10 мкг тотального белка. Под тягой готовили и заливали 10% полиакриламидный разделяющий гель и 5% полиакриламидный концентрирующий гель. Белковый электрофорез проводили в вертикальной камере (Bio-Rad) при 100 V в трис-глициновом буфере с SDS. Перенос белков с геля на мембрану PVDF проводили в приборе Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) в течение 30 мин при 25 V. Затем блокировали

неспецифическое связывание антител с помощью инкубации в 5% обезжиренном молоке (Bio-Rad), далее инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4 °C (см. табл. 2). На следующий день отмывали мембрану PBST (PBS + 0,1% Tween 20); в течение часа инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена; затем отмывали раствором PBST. Визуализировали на гель-документирующей системе ChemiDoc (Bio-Rad) с помощью реактивов ECL Femto-Sensitivity (Invitrogen, США).

Кариотипирование

Кариотипирование проводили, как описано ранее [14].

Выделение РНК и проведение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Выделение РНК проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) использовали вырожденные d(N)10 праймеры («Евроген», Россия) и набор для обратной

транскрипции M-MLV («Евроген») в соответствии с инструкциями производителя. Количественную ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) выполняли с использованием специфических праймеров (см. табл. 1) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad). ПЦР проводили в объёме 20 мкл, использовали готовую смесь 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), концентрация праймеров в реакции составляла 500 нМ. Каждая реакция была поставлена в двух технических повторностях.

Соблюдение этических стандартов

Исследование рассмотрено и одобрено этической комиссией Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 1 от 1.06.2021 г.). Представитель пациента добровольно подписал форму информированного согласия, утверждённую в составе

протокола исследования этическим комитетом НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (протокол № 3 от 17.05.2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание и валидация клеточной модели для изучения функций гена *UBE2A*

В настоящем исследовании мы создали две изогенные клеточные системы ИПСК, включающие линии с нокаутом гена *UBE2A* и с индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A* (рис. 1, а). Данная модель создана на основе полученных ранее двух линий ИПСК, репрограммированных из фибробластов кожи здоровых доноров: линии IPSRG4S (RCPCMi009-A) с мужским кариотипом

а	Исходная линия ИПСК	WT- <i>UBE2A</i> IPSFD5S [22] Здоровый донор, 46XX	WT- <i>UBE2A</i> IPSRG4S [21] Здоровый донор, 46XY
	Нокаут гена <i>UBE2A</i>	KO- <i>UBE2A</i> IPSFD5S Гомозиготная делеция 7 п.н. hg38, chrX:119,574,961-119,574,967	KO- <i>UBE2A</i> IPSRG4S Гомозиготная инсерция 1 п.н. (A) hg38, chrX:119,574,966-119,574,967
	Индукцибельная экспрессия гена <i>UBE2A</i>	Over- <i>UBE2A</i> IPSFD5S Индукция доксициклином	Over- <i>UBE2A</i> IPSRG4S Индукция доксициклином

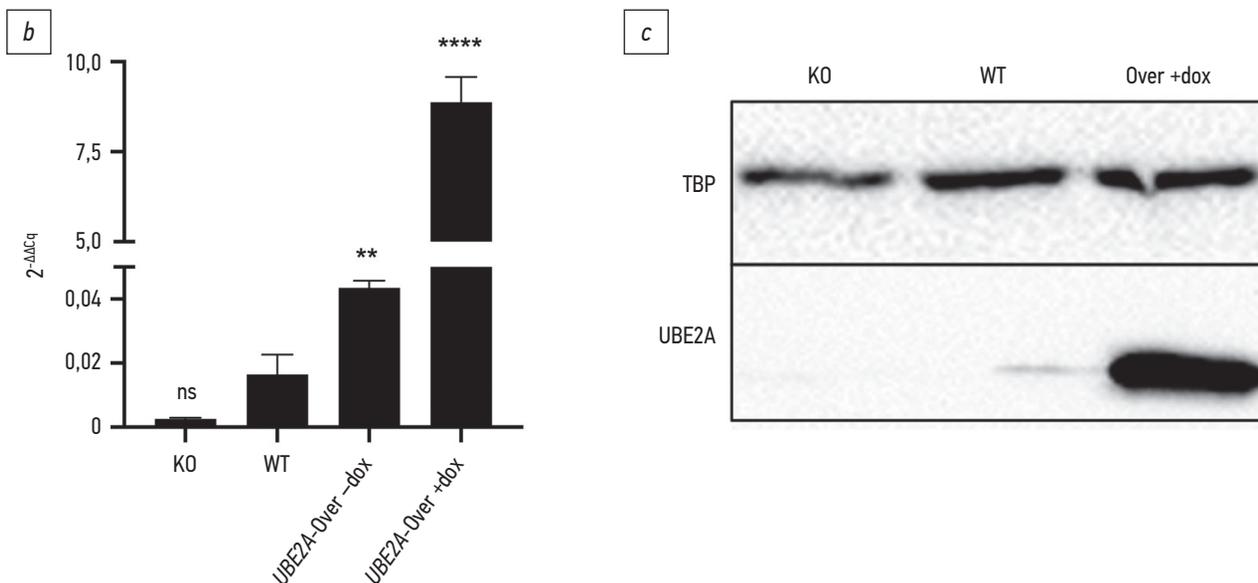


Рис. 1. Клеточная модель на основе ИПСК здоровых доноров для изучения гена *UBE2A*: а — состав клеточной модели; б — валидация методом количественной ОТ-ПЦР изогенной системы, созданной на основе линии IPSFD5S, при помощи анализа экспрессии гена *UBE2A*; в — валидация изогенной системы, созданной на основе линии IPSFD5S, при помощи вестерн-блоттинга с антителами к белку *UBE2A*. Здесь: KO — KO-*UBE2A* IPSFD5S; WT — WT-*UBE2A* IPSFD5S; -dox — Over-*UBE2A* IPSFD5S без индукции доксициклином; Over +dox — Over-*UBE2A* IPSFD5S после индукции доксициклином; $2^{-\Delta\Delta Cq}$ — относительная экспрессия, вычисленная по алгоритму «дельта-дельта Cq»; TBP — TATA-связывающий белок; ** различия с WT статистически значимы, $p < 0,01$; **** различия с WT статистически значимы, $p < 0,0001$; ns — различия с WT статистически не значимы.

Fig. 1. Cell model based on iPSCs of healthy donors for studying *UBE2A* gene: а — iPSC lines of the cell model; б — validation of the iPSCs derived from IPSFD5S by analysis of *UBE2A* gene expression; в — validation of the iPSCs derived from IPSFD5S by western blotting with antibodies to *UBE2A* protein. Here: KO — KO-*UBE2A* IPSFD5S; WT — WT-*UBE2A* IPSFD5S; -dox — Over-*UBE2A* IPSFD5S without doxycycline induction; Over +dox — Over-*UBE2A* IPSFD5S after doxycycline induction; $2^{-\Delta\Delta Cq}$ — relative expression, calculated with delta-delta Cq algorithm; TBP — TATA binding protein; ** difference with WT is significant, $p < 0.01$; **** difference with WT is significant, $p < 0.0001$; ns — difference with WT in not significant.

[21] и линии IPSFD5S с женским кариотипом [22]. Линия IPSRG4S, нокаутная по гену *UBE2A*, была тоже получена ранее [14].

Из ИПСК IPSFD5S получена изогенная линия ИПСК с нокаутом (KO, *англ.* knockout) гена *UBE2A* при помощи геномного CRISPR-Cas9-редактирования. Геномное CRISPR-Cas9-редактирование линии IPSFD5S проводили с использованием нРНК, комплементарной последовательности второго экзона гена *UBE2A*. Редактирование привело к гомозиготной делеции размером 7 п.н. в месте отжига нРНК. Эта делеция в свою очередь приводит к формированию преждевременного стоп-кодона в матричной РНК (мРНК) и, следовательно, к её нонсенсопосредованному распаду. Отсутствие экспрессии белка *UBE2A* в отобранной нокаутной линии подтверждено при помощи вестерн-блоттинга (рис. 1, *c*). Полученная линия ИПСК KO-*UBE2A* IPSFD5S сохранила ЭСК-подобную морфологию (ЭСК — эмбриональные стволовые клетки) и нормальный кариотип (46, XX). Кроме того, эта линия демонстрировала экспрессию маркёров плюрипотентности (OCT4, NANOG, TRA-1-81, SSEA-4) и способность формировать производные трёх зародышевых листков (рис. 2, *b-f*).

Поскольку имеются данные в пользу патогенного эффекта увеличенной дозы гена *UBE2A*, было решено дополнить изогенные системы линиями с увеличенной экспрессией рассматриваемого гена. При получении ИПСК с индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A* использовали лентивирусную трансдукцию, для чего собирали два вируса: вирус с транскриптором системы tet-ON и вирус с CDS гена *UBE2A*. При помощи лентивирусной трансдукции ИПСК IPSRG4S и IPSFD5S получены соответствующие изогенные линии ИПСК с tet-ON-индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A*. Значимое повышение экспрессии данного гена в ответ на обработку клеток доксициклином в течение 72 ч было подтверждено при помощи количественной ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга (рис. 1, *b*; см. рис. 1, *c*). Необходимо отметить, что в ИПСК, прошедших лентивирусную трансдукцию, мы наблюдали некоторое повышение экспрессии гена *UBE2A* даже без индукции доксициклином (данные не показаны). Это может быть связано с несовершенством генетической трансгенной конструкции, в которой промотор трансгена не является полностью «молчащим» в отсутствие индукции доксициклином, что способно становиться ещё более явным за счёт множественных вставок трансгена при лентивирусной трансдукции.

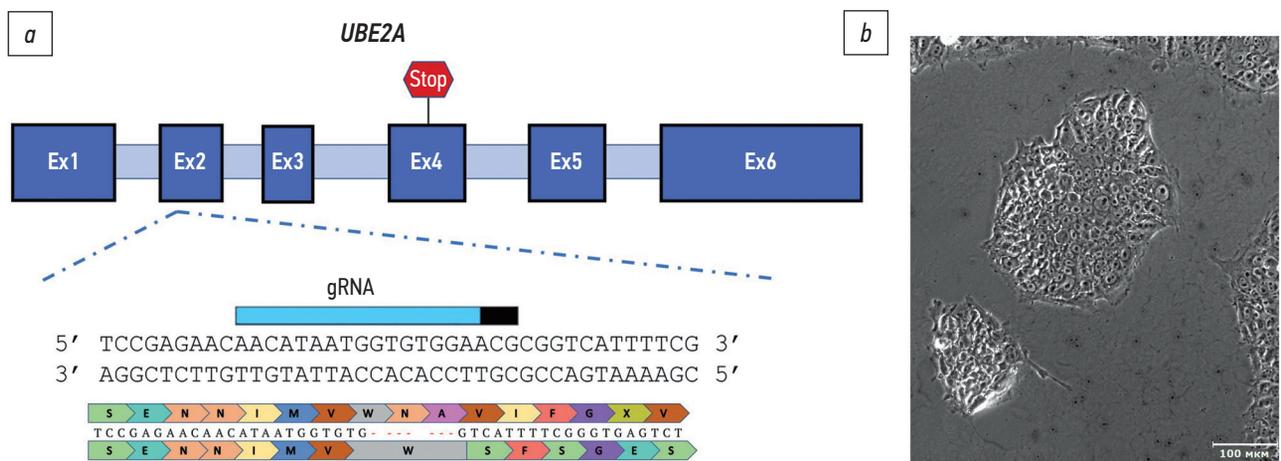
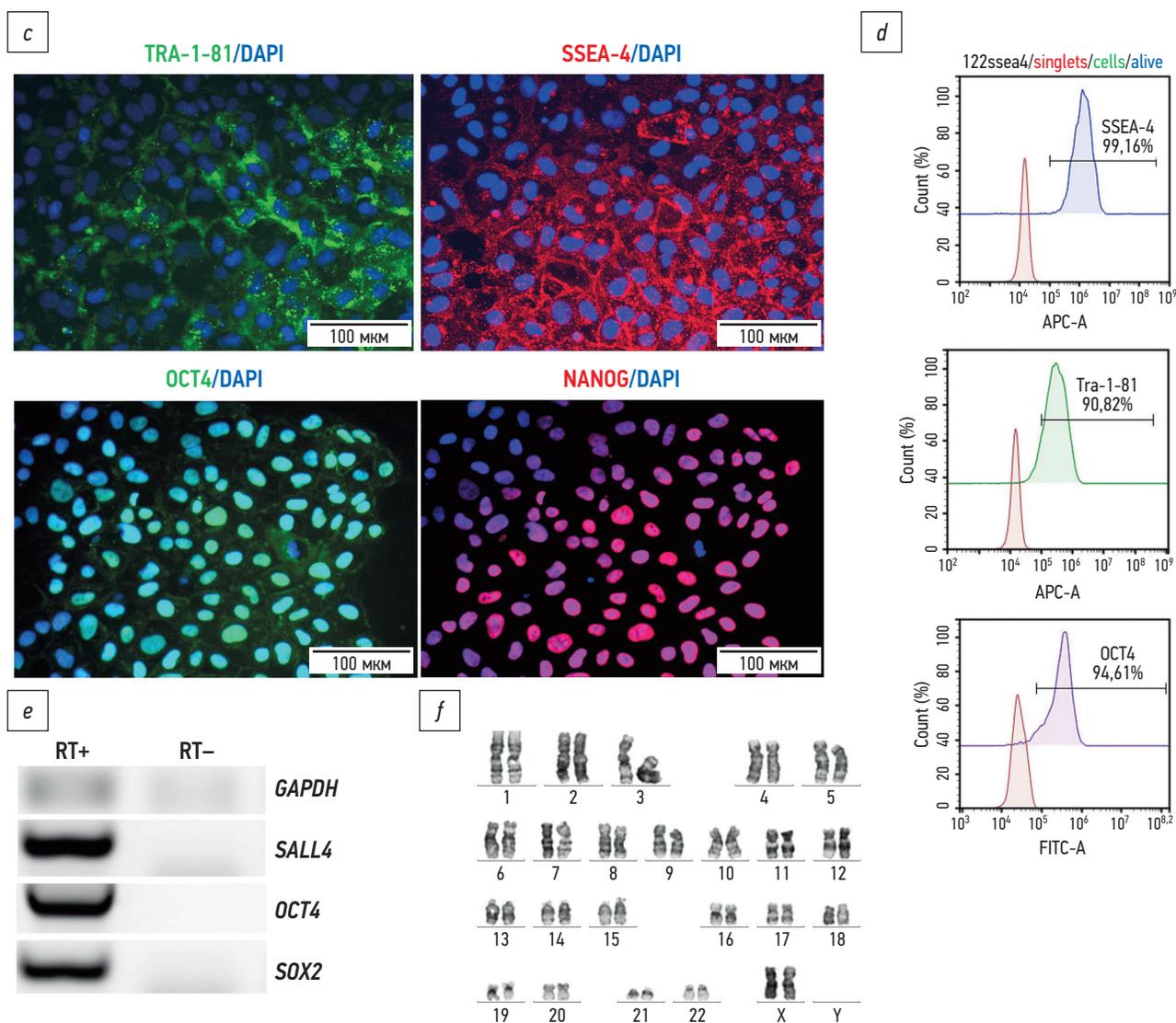


Рис. 2. Характеристика линии ИПСК IPSFD5S, нокаутной по гену *UBE2A*: *a* — локализация направляющей РНК, использованной при редактировании, и полученной делеции размером 7 п.н. во втором экзоне гена *UBE2A*; *b* — ЭСК-подобная морфология колонии ИПСК IPSFD5S; *c* — анализ экспрессии маркёров плюрипотентного состояния OCT4, NANOG, SSEA-4 и TRA-1-81 в ИПСК IPSFD5S методом иммуноцитохимического окрашивания, DAPI — синий цвет, соответствующий маркёр — зелёный или красный; *d* — анализ экспрессии маркёров плюрипотентного состояния OCT4, SSEA-4 и TRA-1-81 в ИПСК IPSFD5S методом проточной цитометрии; *e* — анализ экспрессии генов, характерных для плюрипотентного состояния, в ИПСК IPSFD5S методом количественной ОТ-ПЦР; *f* — дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом выявило в ИПСК IPSFD5S нормальный кариотип 46, XY. Ex — экзоны, RT+ — синтез кДНК с использованием обратной транскриптазы; RT- — синтез кДНК без использования обратной транскриптазы; APC-A — флуоресценция аллофикоцианина, площадь; FITC-A — флуоресценция флуоресцеина, площадь. Остальные обозначения см. в тексте.

Fig. 2. Characterization of KO-*UBE2A* IPSFD5S line: *a* — localization of gRNA used for CRISPR-Cas9 genome editing and the obtained 7 bp deletion in the second exon of the *UBE2A* gene; *b* — ESC-like morphology of KO-*UBE2A* IPSFD5S; *c* — immunocytochemical staining for pluripotency markers OCT4, NANOG, SSEA-4 AND TRA-1-81, DAPI — blue color, corresponding marker — green or red; *d* — cytometry analysis for pluripotency markers OCT4, SSEA-4 and TRA-1-81; *e* — analysis of pluripotency state-specific gene expression in IPSFD5S iPSCs by quantitative RT-PCR; *f* — differential GTG staining of metaphase chromosomes revealed a normal 46, XX karyotype in KO-*UBE2A* IPSFD5S line. Ex — exons, RT+ — cDNA synthesis using reverse transcriptase; RT- — cDNA synthesis using no reverse transcriptase; APC-A — allophycocyanin fluorescence, area; FITC-A — fluorescein fluorescence, area. See text for other designations.



Окончание рис. 2.
End of fig. 2.

Получение и характеристика клеточной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с делецией гена *UBE2A*

Для более детального изучения роли гена *UBE2A* в развитии умственной отсталости была создана линия ИПСК IPS67-7 путём репрограммирования лимфоцитов периферической крови пациента с X-сцепленной умственной отсталостью типа Насименто. У данного пациента ранее была выявлена гемизиготная делеция участка длинного плеча X-хромосомы размером 167,5 тыс. п.о. [8], что приводит к полному отсутствию в его геноме пяти генов, включая ген *UBE2A* (рис. 3, a).

Для получения ИПСК из лимфоцитов пациента с X-сцепленной умственной отсталостью проведена трансфекция неинтегрирующими эписомными плазмидными векторами, экспрессирующими факторы репрограммирования: OCT4, MYC, LIN28, SOX2, KLF4. Эписомы

также несли гены, кодирующие вспомогательные факторы, которые повышают эффективность репрограммирования: белок EBNA1 и C-терминальный фрагмент белка р53 мыши mp53DD [18].

Полученная линия ИПСК IPS67-7 охарактеризована на наличие плюрипотентности. Клеточная линия ИПСК демонстрировала типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток человека (рис. 3, b) и высокую пролиферативную активность. Проточная цитофлуориметрия подтвердила высокую экспрессию маркёров плюрипотентности: транскрипционного фактора OCT4 и поверхностных маркёров SSEA-4 и TRA-1-81 (рис. 3, c). Экспрессия генов плюрипотентности *LIN28*, *SALL4*, *TGDF1* подтверждена методом количественной ОТ-ПЦР, при этом положительным контролем выступала линия ЭСК HUES9, отрицательным контролем — фибробласты кожи здорового донора (рис. 3, d). Визуализация биомаркёров плюрипотентности (транскрипционных факторов OCT4

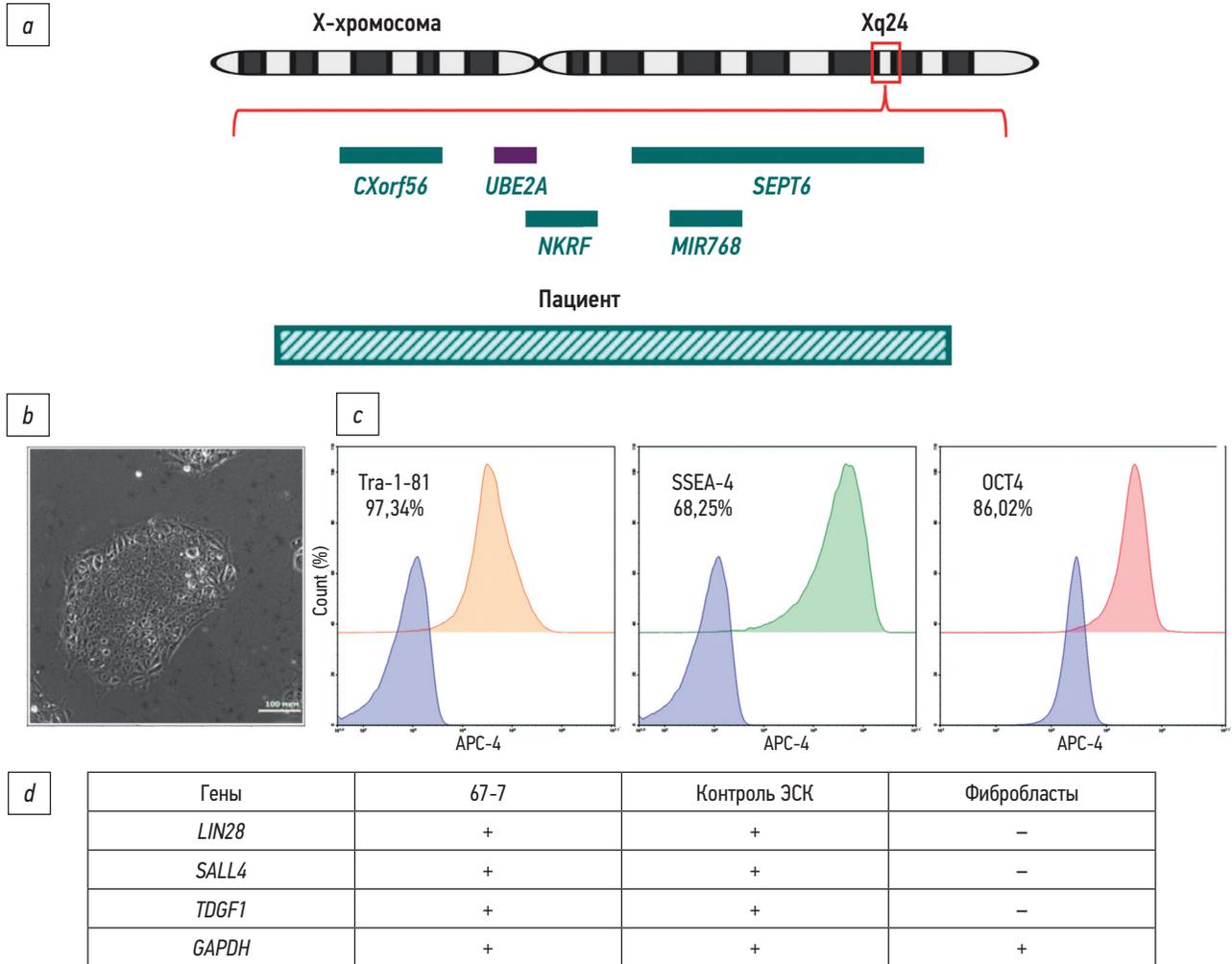
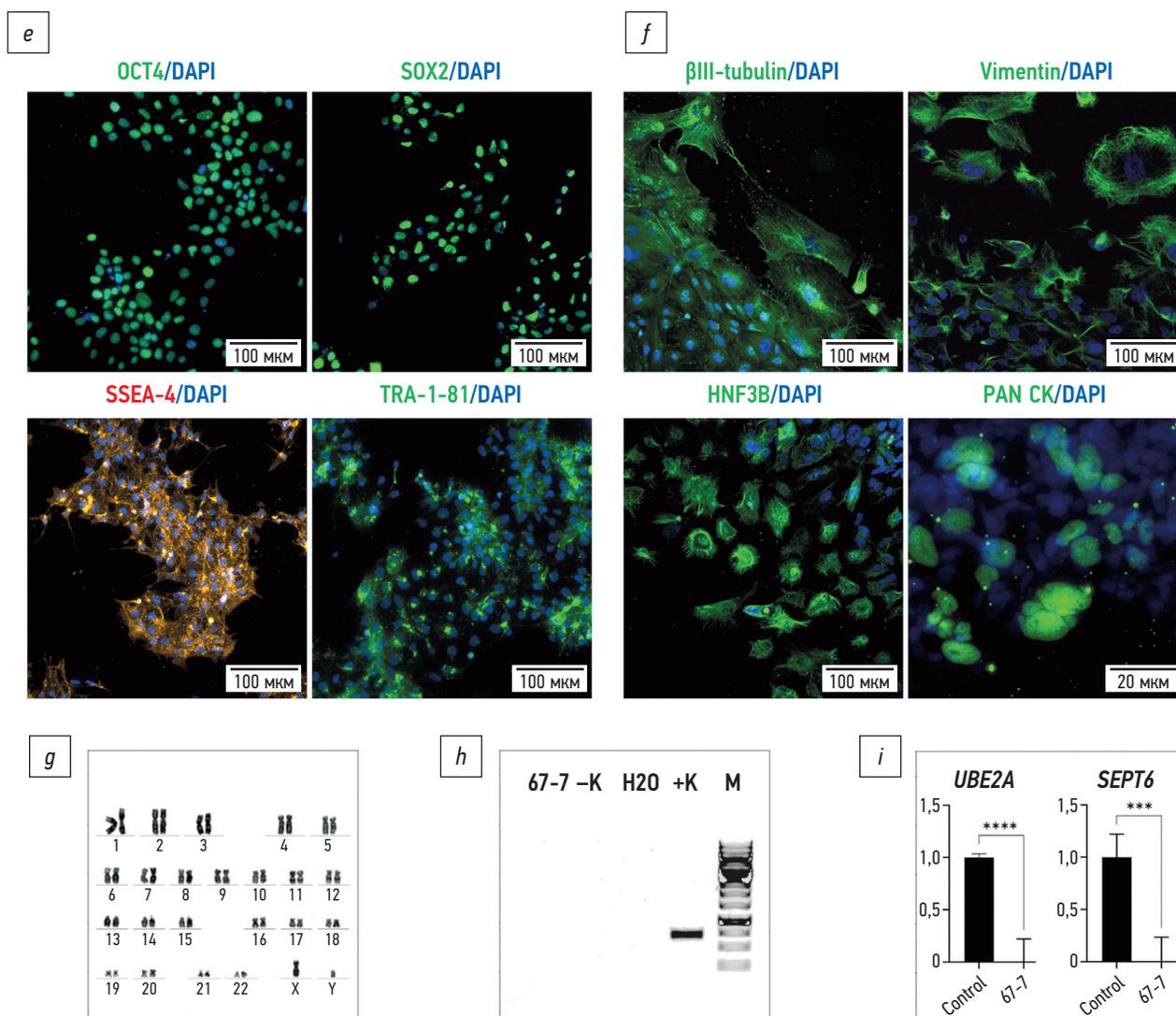


Рис. 3. Характеристика линии ИПСК IPS67-7, полученной из лимфоцитов пациента с синдромом Насименто: *a* — локализация делеции размером 167,5 тыс. п.о. с указанием захваченных делецией генов [8]; *b* — ЭСК-подобная морфология колонии ИПСК IPS67-7; *c* — анализ экспрессии маркеров плюрипотентного состояния OCT4, SSEA-4 и TRA-1-81 в ИПСК IPS67-7 методом проточной цитометрии; *d* — анализ экспрессии генов, характерных для плюрипотентного состояния, в ИПСК IPS67-7 методом количественной ОТ-ПЦР (в качестве положительного контроля служила кДНК ЭСК HUES9, в качестве отрицательного контроля взяты кДНК фибробластов здорового донора); *e* — анализ экспрессии маркеров плюрипотентного состояния OCT4, SOX2, SSEA-4 И TRA-1-81 в ИПСК IPS67-7 методом иммуноцитохимического окрашивания, DAPI — синий цвет, соответствующий маркер — зелёный или красный; *f* — анализ производных спонтанной дифференцировки ИПСК IPS67-7 методом иммуноцитохимического окрашивания; для выявления эктодермальных производных использованы антитела к β III-тубулину (β III-tubulin) и панцитокератину (PAN CK), для выявления мезодермальных производных — антитела к виментину (vimentin), для выявления энтодермальных производных — антитела к FOXA2 (HNF3B), DAPI — синий цвет, соответствующий маркер — зелёный цвет; *g* — дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом выявило в ИПСК IPS67-7 нормальный кариотип 46, XY; *h* — ПЦР-тест не выявил микоплазменной контаминации клеток; 67-7 — ДНК, выделенная из линии IPS67-7; -K — отрицательный контроль, H2O — технический контроль ПЦР, +K — положительный контроль; *i* — верификация наличия делеции в геноме линии IPS67-7 методом количественной ПЦР с праймерами на гены *UBE2A* и *SEPT6*, входящие в состав делеции. В качестве референсного был использован ген *HEXB*; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Обозначения см. в тексте.

Fig. 3. Characterization of iPSC line IPS67-7 derived from lymphocytes of a patient with Nascimento syndrome: *a* — localization of 167.5 Kbp deletion with indication of genes captured by the deletion [8]; *b* — ESC-like morphology of IPS67-7 colony; *c* — flow cytometry analysis for pluripotency markers OCT4, SSEA-4 and TRA-1-81 in IPS67-7; *d* — RT-qPCR analysis for pluripotent gene expression, cDNA of HUES9 ESCs served as a positive control, cDNA of healthy donor fibroblasts was taken as a negative control; *e* — immunocytochemical staining analysis for pluripotency markers OCT4, SOX2, SSEA-4 AND TRA-1-81, DAPI — blue color, corresponding marker — green or red; The scale bar corresponds to 100 μ m; *f* — immunocytochemical staining analysis of spontaneous differentiation derivatives of IPS67-7. Antibodies to β III-tubulin (β III-tubulin) and pancytkeratin (PAN CK) were used to detect ectodermal derivatives, antibodies to vimentin (vimentin) were used to detect mesodermal derivatives, antibodies to FOXA2 (HNF3B) were used to detect entodermal derivatives, DAPI — blue, corresponding marker — green; scale bar — 100 μ m; *g* — differential GTG staining of metaphase chromosomes revealed a normal 46, XY karyotype in IPS67-7; *h* — PCR test did not reveal mycoplasma contamination of cells, 67-7 — DNA isolated from IPS67-7 cells, -K — negative control, H2O — PCR technical control, +K — positive control; *i* — verification of the deletion in IPS67-7 by quantitative PCR with primers for *UBE2A* and *SEPT6* genes. The *HEXB* gene was used as a reference gene; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. See text for designations.



Окончание рис. 3.
End of fig. 3.

и SOX2 и поверхностных маркёров SSEA-4 и TRA-1-81) проведена с помощью иммуноцитохимического окрашивания (рис. 3, e). Способность формировать три зародышевых листка (энто-, мезо- и эктодерму) клетками IPS67-7 подтверждена с помощью спонтанной *in vitro* дифференцировки через стадию эмбрионидных телец. Полученные дифференцированные клетки демонстрировали экспрессию биомаркёров эктодермы (панцитокератин, β III-тубулин), мезодермы (виментин) и энтодермы (FOXA2) (рис. 3, f). Анализ кариотипа, проведённый на 14-м пассаже, показал, что полученная линия ИПСК демонстрирует стабильный хромосомный состав и нормальный кариотип (46, XY) (рис. 3, g). При помощи количественной ПЦР с праймерами, специфичными к делетированному участку X-хромосомы, подтверждено наличие делеции в ИПСК пациента с синдромом Насименто (рис. 3, i). Полученные ИПСК на 18-м пассаже проверены на интеграцию эписом в геном. Эта проверка показала, что геном полученной линии содержит трансгены *OCT4*, *EBNA1* и *mp53DD*,

причём трансген *mp53DD* сохраняет заметную экспрессию в ИПСК на 18-м пассаже (данные не показаны).

Морфометрия клеточного ядра в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток полученной модели

При проведении иммуноцитохимического окрашивания во время характеристики полученных линий ИПСК стало очевидно, что нокаут гена *UBE2A* и его гиперэкспрессия приводят к увеличению размеров ядер клеток (рис. 4). Морфометрический анализ в линиях ИПСК полученной модели показал значимое увеличение площади ядер в модифицированных ИПСК, причём наиболее яркий эффект наблюдался в ИПСК с индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A* (табл. 4).

Увеличение ядер в нокаутных ИПСК удалось зафиксировать только в сравнении с изогенной исходной линией ИПСК. Например, у ИПСК IPSFD5S средняя площадь ядер составляет $101,4 \pm 0,9$ мкм², а в изогенном нокаутном

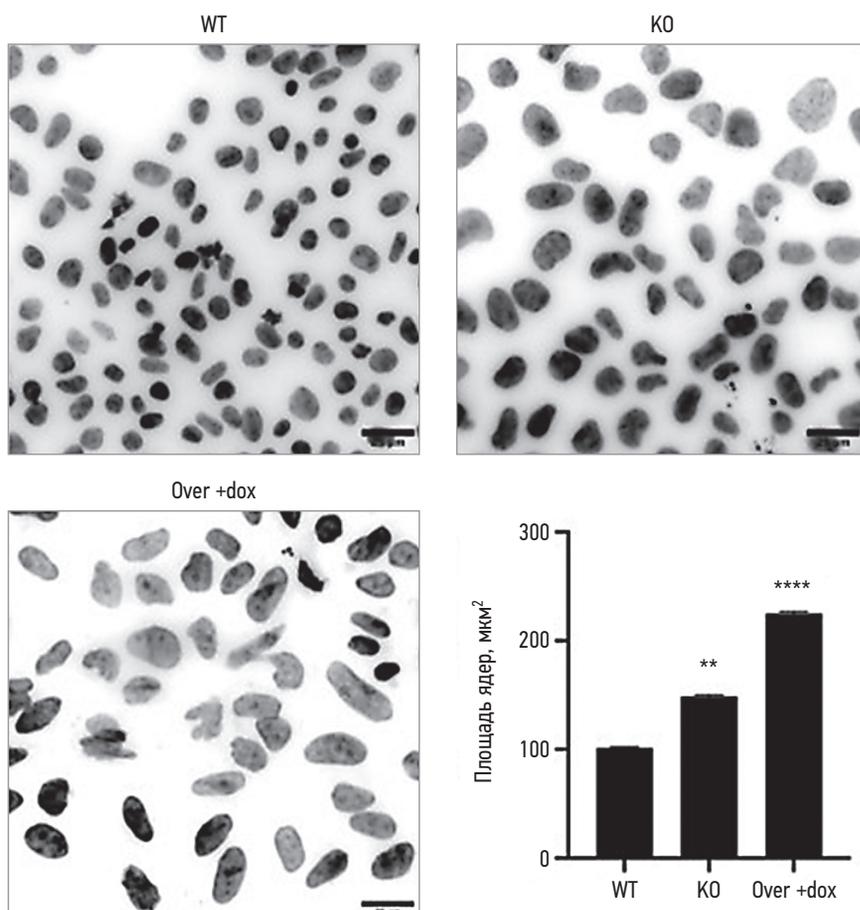


Рис. 4. Площадь клеточного ядра у линий ИПСК с нокаутом п. 54 (KO) и гиперэкспрессией гена *UBE2A* п. 46 (Over +dox) статистически значимо больше, чем у исходной линии IPSFD5S п. 52 (WT); ** отличия от исходной линии ИПСК статистически значимы, $p < 0,01$; t-критерий Стьюдента, **** отличия от исходной линии статистически значимы, $p < 0,0001$; t-критерий Стьюдента. Бар — 25 μm , усы гистограммы означают стандартную ошибку среднего.

Fig. 4. Cell nuclei area in KO-*UBE2A* IPSFD5S p. 54 (KO) and Over-*UBE2A* IPSFD5S p. 52 (Over +dox) is significantly larger than in the isogenic normal IPSFD5S p. 46 (WT), ** difference from the normal iPSCs is significant, $p < 0.01$; Student's t-test; **** difference from the normal iPSCs is significant, $p < 0.0001$, Student's t-test. Scale bar — 25 μm , histogram whiskers indicate standard error of mean.

Таблица 4. Результаты измерений площади клеточного ядра в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках клеточной модели

Table 4. Results of measurements of nuclei area in the induced pluripotent stem cells of cell model

Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	Статус гена <i>UBE2A</i>	Измерено ядер	Площадь ядра \pm SEM, μm^2
IPSFD5S	Дикий тип	2127	101,4 \pm 0,9
KO- <i>UBE2A</i> IPSFD5S	Нокаут	2130	148,7 \pm 1,3**
Over- <i>UBE2A</i> IPSFD5S	Гиперэкспрессия	10225	220,6 \pm 0,8****
IPSRG4S	Дикий тип	1007	156,9 \pm 2,6
KO- <i>UBE2A</i> IPSRG4S	Нокаут	1600	188,4 \pm 2,5**
Over- <i>UBE2A</i> IPSRG4S	Гиперэкспрессия	2457	278,6 \pm 1,7****
IPS67-6	Делеция	282	136,7 \pm 2,8

** различия с изогенными нормальными индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками статистически значимы, $p < 0,01$; t-критерий Стьюдента;

**** различия с изогенными нормальными индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками статистически значимы, $p < 0,0001$; t-критерий Стьюдента.

** differences with isogenic normal induced pluripotent stem cells were statistically significant, $p < 0.01$; Student's t-test; **** differences with isogenic normal induced pluripotent stem cells were statistically significant, $p < 0.0001$; Student's t-test.

клоне — 148,7 \pm 1,3 μm^2 , и это ниже, чем у нормальных мужских ИПСК IPSRG4S (см. табл. 4). Однако у нокаутных производных мужских ИПСК IPSRG4S средняя площадь ядра больше, чем в исходных нормальных ИПСК, и составляет 188,4 \pm 2,5 μm^2 (см. табл. 4). Средняя площадь ядра у ИПСК пациента с делецией гена *UBE2A* близка по размеру к нокаутным клонам женской линии FD5S и равна 136,7 \pm 2,8 μm^2 (см. табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Белок *UBE2A* очень консервативен, и его аминокислотная последовательность является идентичной среди позвоночных [5]. Следовательно, можно предположить, что существует высокое селективное давление, направленное против возникновения новых вариантов белка. Кроме того, селекцией, по крайней мере

на уровне соматических клеток, можно объяснить тот факт, что в клетках крови у матерей пациентов с синдромом Насименто наблюдается 100% неслучайная инактивация X-хромосомы [6, 8]. Однако нокаут по этому гену не является летальным у мышей, и только гомозиготный нокаут гена *UBE2A* приводит к стерильности у самок [9]. Для объяснения такого противоречия можно предположить, что мутации в гене *UBE2A* могут быть нелетальными только в определённом генетическом контексте. В пользу такого предположения говорит крайняя редкость синдрома Насименто, а также установленный нами факт, что эффект нокаута гена *UBE2A* на площадь клеточного ядра в ИПСК можно обнаружить только при сравнении изогенных клеток. Таким образом, созданная нами модель, включающая две изогенные системы ИПСК и ИПСК пациента с синдромом Насименто, может помочь не только изучить эффект дисфункции гена *UBE2A* вне влияния генетического фона, но и показать, как дисфункция этого гена проявляется в различном генетическом окружении.

В нашей работе мы репрограммировали лимфоциты крови пациента с синдромом Насименто неинтегративным способом с использованием эписомной трансфекции [18]. Однако полученные нами ИПСК демонстрируют интеграцию в геном трёх (*OCT4*, *EBNA1* и *mp53DD*) из семи трансгенов, которые были внесены при репрограммировании. Трансген *OCT4* кодирует транскрипционный фактор *OCT4*, который является одним из четырёх основных факторов репрограммирования, входящих в так называемый коктейль Яманаки [23]. Трансген *EBNA1* кодирует белок вируса Эпштейна–Барр *EBNA1*, который способствует экстрахромосомной репликации эписом, а также может связывать белок p53 и предотвращать его активность в качестве транскрипционного фактора. Трансген *mp53DD* кодирует C-терминальный фрагмент белка p53 мыши, который обладает доминантно-негативным действием, препятствуя образованию функциональных тетрамеров белка p53 [18]. Трансгены *EBNA1* и *OCT4* не демонстрируют экспрессии в ИПСК на 18-м пассаже, т.е. можно предположить, что они подверглись эпигенетическому сайленсингу, обычно происходящему с вносимыми экзогенными факторами по завершении репрограммирования. Известно, что остаточная активность экзогенных факторов репрограммирования нарушает способность ИПСК к дифференцировке [24], в то время как мы показали, что полученные нами ИПСК пациента способны к дифференцировке в производные всех трёх зародышевых листков. Таким образом, можно предположить, что интегрировавшийся трансген *OCT4* подвергся надёжному сайленсингу.

Мы обнаружили, что, в отличие от трансгенов *EBNA1* и *OCT4*, антиапоптотический трансген *mp53DD* продолжает экспрессироваться в ИПСК пациента 18-го пассажа. Известно, что плюрипотентные стволовые клетки человека в культуре *in vitro* предрасположены к повышению дозы антиапоптотических генов. Так, тонкий цитогенетический анализ более 120 линий ЭСК человека показал,

что во многих из них наблюдается рекуррентная дупликация региона 20q11.21, содержащего антиапоптотический ген *BCL2L1* [25]. Интеграция трансгена *mp53DD* и сохранение его экспрессии даже в ИПСК продвинутых пассажей говорит о невозможности использования полученной линии ИПСК IPS67-7 в исследованиях, где изучаются апоптоз или цитотоксичность. Тем не менее данная линия ИПСК прошла все тесты на плюрипотентность, в том числе и на способность к дифференцировке в производные трёх зародышевых листков, поэтому её можно использовать как дополнительную к нашей изогенной системе, созданной на основе ИПСК двух здоровых доноров.

Количественная ОТ-ПЦР показала, что нокаут гена *UBE2A* приводит к незначительному снижению количества мРНК *UBE2A*, и валидировать нокаут в ИПСК удалось только при помощи вестерн-блоттинга с антителами к белку *UBE2A*. По данным базы данных The Human Proteome Atlas [26], доступные на рынке коммерческие антитела не обладают достаточной специфичностью к *UBE2A* из-за кросс-реактивности к его очень близкому гомологу, белку *UBE2B*. Иными словами, валидация успешности нокаута в нашей работе стала возможной из-за того, что экспрессия белка *UBE2B* в ИПСК значительно ниже, чем белка *UBE2A*. Однако кросс-реактивность антител не позволяет применять вестерн-блоттинг или иммуноцитохимическое окрашивание в дифференцированных нейральных клетках-предшественниках, где использованные антитела к *UBE2A* «узнавали» некий белковый продукт даже в клетках пациента при полном отсутствии локуса гена *UBE2A* (данные не показаны). Полученная нами клеточная модель, в состав которой входят ИПСК с делецией и гиперэкспрессией гена *UBE2A*, может служить хорошей валидационной базой для получения антител, специфичных к *UBE2A* без кросс-реактивности к *UBE2B*.

Мы обнаружили, что ИПСК с нокаутом или гиперэкспрессией гена *UBE2A* характеризуются большей средней площадью ядер по сравнению с исходной линией ИПСК. Ранее аномальное увеличение клеточных ядер продемонстрировано для клеток с гиперэкспрессией гена *UBE2B*, который обладает высокой гомологией с геном *UBE2A* [27]. Увеличение средней площади ядра в клеточной популяции может быть связано со множеством причин, например: с увеличением доли клеток на стадии G2, уплотнением клеток за счёт увеличения клеточной адгезии, изменениями в динамике ядерно-цитоплазматического транспорта и т.д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы создали клеточную модель на основе ИПСК для изучения роли гена *UBE2A* в патогенезе синдрома Насименто. Данная модель содержит две изогенные клеточные системы, созданные на основе ИПСК двух здоровых доноров. Изогенные клеточные системы состоят из ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*, ИПСК

с индуцибельной гиперэкспрессией гена *UBE2A* и нормальных исходных ИПСК. Модель дополнена линией ИПСК пациента с синдромом Насименто, который вызван делецией участка X-хромосомы, содержащего ген *UBE2A*. С помощью данной модели мы впервые показали, что как нокаут, так и гиперэкспрессия гена *UBE2A* приводят к значительному увеличению средней площади ядер в ИПСК по сравнению с изогенным контролем. Мы также продемонстрировали, что морфологический эффект нокаута гена *UBE2A* в ИПСК можно выявить только в изогенном контексте, что, вероятно, говорит о важности генетического фона для проявления мутаций в гене *UBE2A*. Полученная модель может быть использована для фундаментальных исследований функций гена *UBE2A*, включая его молекулярные и клеточные функции в нейрогенезе. Возможно также её использование для получения антител, специфичных к белку *UBE2A* и не обладающих кросс-реактивностью к гомологичному белку *UBE2B*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Благодарности. Авторы благодарят Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России за помощь в секвенировании по Сэнгеру.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 21-65-00017.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е.А. Хомякова и А.В. Федоренко выполняли культуральную и молекулярно-генетическую часть работы, связанную с генетической модификацией ИПСК и их характеристикой, внесли равный вклад в подготовку

статьи; М.М. Гридина, А.А. Хабарова получали ИПСК пациента с синдромом Насименто; А.А. Кашеварова, Д.А. Федотов, Т.В. Лиманская выполняли характеристику ИПСК пациента; А.В. Сурдина и Л.Д. Беликова провели анализ экспрессии маркеров плюрипотентности методом иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитометрии соответственно; Е.А. Воловиков и Е.К. Секретова осуществляли вестерн-блоттинг; Е.А. Зеркаленкова выполнила анализ кариотипа линий ИПСК; М.А. Лагарькова, И.Н. Лебедев и А.Н. Богомазова разработали дизайн эксперимента, провели анализ полученных данных и участвовали в написании статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgments. We are grateful to the Center for High-Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine for assistance in Sanger sequencing.

Funding source. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (grant N 21-65-00017).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. E.A. Khomyakova and A.V. Fedorenko performed the cultivation and genetic modification of iPSCs and their characterization and contributed equally to the article; M.M. Gridina and A.A. Khabarova obtained iPSCs from a patient with Nascimento syndrome; A.A. Kashevarova, D.A. Fedotov, and T.V. Limanskaya characterized the iPSCs of the patient; A.V. Surdina and L.D. Belikova analyzed the expression of pluripotency markers by immunocytochemical staining and flow cytometry, respectively; E.A. Volovikov and E.K. Sekretova performed western blotting; E.A. Zerkalnikova analyzed the karyotype of iPSC lines; M.A. Lagarkova, I.N. Lebedev, and A.N. Bogomazova developed the design of the experiment, analyzed the obtained data, and participated in writing the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Haddad D.M., Vilain S., Vos M., et al. Mutations in the intellectual disability gene *Ube2a* cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy // *Mol Cell*. 2013. Vol. 50, N 6. P. 831–843. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.012
- Fu J., Liao L., Balaji K.S., et al. Epigenetic modification and a role for the E3 ligase RNF40 in cancer development and metastasis // *Oncogene*. 2021. Vol. 40, N 3. P. 465–474. doi: 10.1038/s41388-020-01556-w
- Yamada T., Imamachi N., Imamura K., et al. Systematic analysis of targets of pumilio-mediated mRNA decay reveals that PUM1 repression by DNA damage activates translesion synthesis // *Cell Rep*. 2020. Vol. 31, N 5. P. 107542. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107542
- Barnsby-Greer L., Mabbitt P.D., Dery M.A., et al. An atypical E3 ligase module in UBR4 mediates destabilization of N-degron substrates // *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.05.08.539884
- Nascimento R.M., Otto P.A., de Brouwer A.P., Vianna-Morgante A.M. *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // *Am J Hum Genet*. 2006. Vol. 79, N 3. P. 549–555. doi: 10.1086/507047
- Czeschik J.C., Bauer P., Buiting K., et al. X-linked intellectual disability type Nascimento is a clinically distinct, probably underdiagnosed entity // *Orphanet J Rare Dis*. 2013. Vol. 8. P. 146. doi: 10.1186/1750-1172-8-146
- Kopanos C., Tsiolkas V., Kouris A., et al. VarSome: the human genomic variant search engine // *Bioinformatics*. 2019. V. 35, N 11. P. 1978–1980. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897
- Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., et al. Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from *UBE2A* deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // *Cytogenet Genome Res*. 2020. Vol. 160, N 5. P. 245–254. doi: 10.1159/000508050
- Roest H.P., Baarends W.M., de Wit J., et al. The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential

- for early embryonic development in mice // *Mol Cell Biol*. 2004. Vol. 24, N 12. P. 5485–5495. doi: 10.1128/MCB.24.12.5485-5495.2004
10. Foglizzo M., Day C.L. E2 enzymes: lessons in ubiquitin transfer from XLID patients // *Nat Chem Biol*. 2019. Vol. 15, N 1. P. 6–7. doi: 10.1038/s41589-018-0191-4
11. Park I.H., Arora N., Huo H., et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells // *Cell*. 2008. Vol. 134, N 5. P. 877–886. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041
12. Ereemeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomiakova M.E., et al. Cerebral organoids — challenges to establish a brain prototype // *Cells*. 2021. Vol. 10, N 7. P. 1790. doi: 10.3390/cells10071790
13. Crook J.M., Wallace G., Tomaskovic-Crook E. The potential of induced pluripotent stem cells in models of neurological disorders: implications on future therapy // *Expert Rev Neurother*. 2015. Vol. 15, N 3. P. 295–304. doi: 10.1586/14737175.2015.1013096
14. Deshpande A., Yadav S., Dao D.Q., et al. Cellular phenotypes in human iPSC-derived neurons from a genetic model of autism spectrum disorder // *Cell Rep*. 2017. Vol. 21, N 10. P. 2678–2687. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.037
15. Хомякова Е.А., Федоренко А.В., Сурдина А.В., и др. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi009-A-1 с нокаутом гена UBE2A с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 // *Онтогенез*. 2024. (In press). doi: 10.31857/S0475145023060046
16. van Kuppeveld F.J., van der Logt J.T., Angulo A.F., et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification // *Appl Environ Microbiol*. 1992. Vol. 58, N 8. P. 2606–2615. Corrected and republished from: *Appl Environ Microbiol*. 1993. Vol. 59, N 2. P. 655. doi: 10.1128/aem.58.8.2606-2615.1992
17. Concordet J.P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens // *Nucleic Acids Res*. 2018. Vol. 46, W1. P. W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354
18. Pliatsika V., Rigoutsos I. “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs // *Biol Direct*. 2015. Vol. 10, P. 4. doi: 10.1186/s13062-015-0035-z
19. Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells*. 2013. Vol. 31, N 3. P. 458–466. doi: 10.1002/stem.1293
20. Gridina M.M., Nurislamov A.R., Minina J.M., et al. Generation of iPSC cell line (ICGi040-A) from skin fibroblasts of a patient with ring small supernumerary marker chromosome 4 // *Stem Cell Res*. 2022. Vol. 61. P. 102740. doi: 10.1016/j.scr.2022.102740
21. Holmqvist S., Lehtonen Š., Chumarina M., et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients // *NPJ Parkinsons Dis*. 2016. Vol. 2. P. 16009. doi: 10.1038/npjparkd.2016.9
22. Benedetti M.C., D’Andrea T., Colantoni A., et al. Cortical neurons obtained from patients-derived GNAO1 iPSCs show altered differentiation and functional properties // *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.06.15.545051
23. Shi Y., Inoue H., Wu J.C., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress // *Nat Rev Drug Discov*. 2017. Vol. 16, N 2. P. 115–130. doi: 10.1038/nrd.2016.245
24. Ramos-Mejía V., Montes R., Bueno C., et al. Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 4. P. e35824. doi: 10.1371/journal.pone.0035824
25. International Stem Cell Initiative; Amps K., Andrews P.W., et al. 2011. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage // *Nat Biotechnol*. 2011. Vol. 29, N 12. P. 1132–1144. doi: 10.1038/nbt.2051
26. Uhlén M., Björling E., Agaton C., et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics // *Mol Cell Proteomics*. 2005. Vol. 4, N 12. P. 1920–1932. doi: 10.1074/mcp.M500279-MCP200
27. Shekhar M.P., Lyakhovich A., Visscher D.W., et al. Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy, and transformation. // *Cancer Res*. 2002. Vol. 62, N 7. P. 2115–2124.

REFERENCES

1. Haddad DM, Vilain S, Vos M, et al. Mutations in the intellectual disability gene *Ube2a* cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy. *Mol Cell*. 2013;50(6):831–843. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.012
2. Fu J, Liao L, Balaji KS, et al. Epigenetic modification and a role for the E3 ligase RNF40 in cancer development and metastasis. *Oncogene*. 2021;40(3):465–474. doi: 10.1038/s41388-020-01556-w
3. Yamada T, Imamachi N, Imamura K, et al. Systematic analysis of targets of pumilio-mediated mRNA decay reveals that PUM1 repression by DNA damage activates translesion synthesis. *Cell Rep*. 2020;31(5):107542. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107542
4. Barnsby-Greer L, Mabbitt PD, Dery MA, et al. An atypical E3 ligase module in UBR4 mediates destabilization of N-degron substrates. *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.05.08.539884
5. Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):549–555. doi: 10.1086/507047
6. Czeschik JC, Bauer P, Buiting K, et al. X-linked intellectual disability type Nascimento is a clinically distinct, probably underdiagnosed entity. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:146. doi: 10.1186/1750-1172-8-146
7. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978–1980. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897
8. Tolmacheva EN, Kashevarova AA, Nazarenko LP, et al. Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from UBE2A deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss. *Cytogenet Genome Res*. 2020;160(5):245–254. doi: 10.1159/000508050
9. Roest HP, Baarends WM, de Wit J, et al. The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5485–5495. doi: 10.1128/MCB.24.12.5485-5495.2004
10. Foglizzo M, Day CL. E2 enzymes: lessons in ubiquitin transfer from XLID patients. *Nat Chem Biol*. 2019;15(1):6–7. doi: 10.1038/s41589-018-0191-4

11. Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134(5):877–886. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041
12. Ereemeev AV, Lebedeva OS, Bogomiakova ME, et al. Cerebral organoids—challenges to establish a brain prototype. *Cells*. 2021;10(7):1790. doi: 10.3390/cells10071790
13. Crook JM, Wallace G, Tomaskovic-Crook E. The potential of induced pluripotent stem cells in models of neurological disorders: implications on future therapy. *Expert Rev Neurother*. 2015;15(3):295–304. doi: 10.1586/14737175.2015.1013096
14. Deshpande A, Yadav S, Dao DQ, et al. Cellular phenotypes in human iPSC-derived neurons from a genetic model of autism spectrum disorder. *Cell Rep*. 2017;21(10):2678–2687. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.037
15. Khomyakova EA, Fedorenko AV, Surdina AV, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCM1009-A-1) with knockout of the UBE2A gene by CRISPR/CAS9 genome editing. *Ontogenez*. 2024. (In press). doi: 10.31857/S0475145023060046
16. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2606–2615. Corrected and republished from: *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(2):655. doi: 10.1128/aem.58.8.2606-2615.1992
17. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354
18. Pliatsika V, Rigoutsos I. “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biol Direct*. 2015;10:4. doi: 10.1186/s13062-015-0035-z
19. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013;31(3):458–466. doi: 10.1002/stem.1293
20. Gridina MM, Nurislamov AR, Minina JM, et al. Generation of iPSC cell line (ICGi040-A) from skin fibroblasts of a patient with ring small supernumerary marker chromosome 4. *Stem Cell Res*. 2022;61:102740. doi: 10.1016/j.scr.2022.102740
21. Holmqvist S, Lehtonen Š, Chumarina M, et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016;2:16009. doi: 10.1038/npjparkd.2016.9
22. Benedetti MC, D’Andrea T, Colantoni A, et al. Cortical neurons obtained from patients-derived GNAO1 iPSCs show altered differentiation and functional properties. *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.06.15.545051
23. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):115–130. doi: 10.1038/nrd.2016.245
24. Ramos-Mejía V, Montes R, Bueno C, et al. Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS One*. 2012;7(4):e35824. doi: 10.1371/journal.pone.0035824
25. International Stem Cell Initiative; Amps K, Andrews PW, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011;29(12):1132–1144. doi: 10.1038/nbt.2051
26. Uhlén M, Bjorling E, Agaton C, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(12):1920–1932. doi: 10.1074/mcp.M500279-MCP200
27. Shekhar MP, Lyakhovich A, Visscher DW, et al. Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy, and transformation. *Cancer Res*. 2002;62(7):2115–2124.

ОБ АВТОРАХ

* **Богомазова Александра Никитична**, канд. биол. наук, доцент;
адрес: Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а;
ORCID: 0000-0003-1549-1984;
eLibrary SPIN: 8093-8009;
e-mail: abogomazova@rcpcm.org

Федоренко Алиса Викторовна;
ORCID: 0009-0008-1090-2477;
e-mail: afedorenko00@gmail.com

Хомякова Екатерина Александровна;
ORCID: 0000-0001-5387-5554;
eLibrary SPIN: 1573-1381;
e-mail: kate.hom@gmail.com

Сурдина Анастасия Владимировна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-5484-2049;
eLibrary SPIN: 5261-7407;
e-mail: asya.surdina@gmail.com

Секретова Елизавета Константиновна;
ORCID: 0000-0001-7859-920X;
eLibrary SPIN: 4618-0793;
e-mail: Sekretova.1999@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Alexandra N. Bogomazova**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;
address: 1a Malaya Pirogovskaya street, 119435 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0003-1549-1984;
eLibrary SPIN: 8093-8009;
e-mail: abogomazova@rcpcm.org

Alisa V. Fedorenko;
ORCID: 0009-0008-1090-2477;
e-mail: afedorenko00@gmail.com

Ekaterina A. Khomyakova;
ORCID: 0000-0001-5387-5554;
eLibrary SPIN: 1573-1381;
e-mail: kate.hom@gmail.com

Anastasia V. Surdina, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-5484-2049;
eLibrary SPIN: 5261-7407;
e-mail: asya.surdina@gmail.com

Elizaveta K. Sekretova;
ORCID: 0000-0001-7859-920X;
eLibrary SPIN: 4618-0793;
e-mail: Sekretova.1999@mail.ru

Лиманская Татьяна Викторовна;

ORCID: 0009-0001-9177-2342;
eLibrary SPIN: 1443-7747;
e-mail: perunat@bk.ru

Беликова Лилия Дмитриевна;

ORCID: 0000-0003-0887-3415;
eLibrary SPIN: 2949-7522;
e-mail: shuvalova_l@inbox.ru

Воловиков Егор Алексеевич;

ORCID: 0000-0002-0346-6194;
eLibrary SPIN: 7413-0278;
e-mail: volovikovea@gmail.com

Гридина Мария Михайловна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-7972-5949;
eLibrary SPIN: 4251-8865;
e-mail: gridina@bionet.nsc.ru

Хабарова Анна Александровна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-9425-9763;
eLibrary SPIN: 7440-7804;
e-mail: khabarova@bionet.nsc.ru

Кашеварова Анна Александровна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-0716-4302;
eLibrary SPIN: 2161-4386;
e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Федотов Дмитрий Андреевич;

ORCID: 0000-0002-0295-3230;
eLibrary SPIN: 2631-6989;
e-mail: dmitry.fedotov@medgenetics.ru

Зеркаленкова Елена Александровна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0001-9634-5828;
eLibrary SPIN: 4866-1393;
e-mail: eazerkalenkova@gmail.com

Лагарькова Мария Андреевна, д-р биол. наук,

член-корреспондент РАН;
ORCID: 0000-0001-9594-1134;
eLibrary SPIN: 4315-1701;
e-mail: lagar@rcpcm.org

Лебедев Игорь Николаевич, д-р биол. наук,

профессор РАН;
ORCID: 0000-0002-0482-8046;
eLibrary SPIN: 5312-9250;
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Tatiana V. Limanskaya;

ORCID: 0009-0001-9177-2342;
eLibrary SPIN: 1443-7747;
e-mail: perunat@bk.ru

Lilia D. Belikova;

ORCID: 0000-0003-0887-3415;
eLibrary SPIN: 2949-7522;
e-mail: shuvalova_l@inbox.ru

Egor A. Volovikov;

ORCID: 0000-0002-0346-6194;
eLibrary SPIN: 7413-0278;
e-mail: volovikovea@gmail.com

Maria M. Gridina, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-7972-5949;
eLibrary SPIN: 4251-8865;
e-mail: gridina@bionet.nsc.ru

Anna A. Khabarova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-9425-9763;
eLibrary SPIN: 7440-7804;
e-mail: khabarova@bionet.nsc.ru

Anna A. Kashevarova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-0716-4302;
eLibrary SPIN: 2161-4386;
e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Dmitry A. Fedotov;

ORCID: 0000-0002-0295-3230;
eLibrary SPIN: 2631-6989;
e-mail: dmitry.fedotov@medgenetics.ru

Elena A. Zerkalenkova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-9634-5828;
eLibrary SPIN: 4866-1393;
e-mail: eazerkalenkova@gmail.com

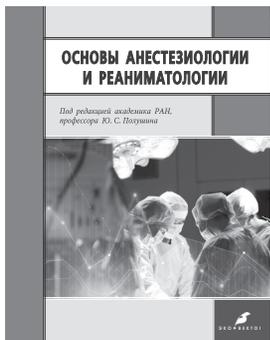
Maria A. Lagarkova, Dr. Sci. (Biology),

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences;
ORCID: 0000-0001-9594-1134;
eLibrary SPIN: 4315-1701;
e-mail: lagar@rcpcm.org

Igor N. Lebedev, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian

Academy of Sciences;
ORCID: 0000-0002-0482-8046;
eLibrary SPIN: 5312-9250;
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

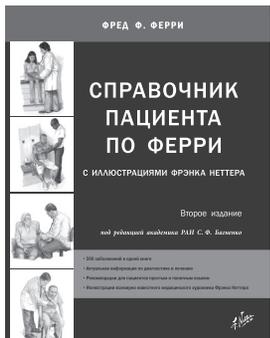


Александрович Ю.С., Барсукова И.М. и др.; под ред. Ю.С. Полушина
ОСНОВЫ АНЕСТЕЗИОЛОГИИ И РЕАНИМАТОЛОГИИ

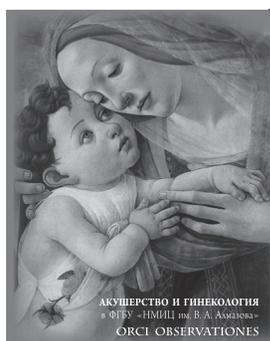
НОВИНКА



ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДИКТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ
Под ред. В.С. Баранова



Ферри Фред Ф., Багненко С.Ф.
СПРАВОЧНИК ПАЦИЕНТА ПО ФЕРРИ



АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ
в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
ORCSI OBSERVATIONES
Под ред. И.Е. Зазерской

ИНТЕРНЕТ-МАГАЗИН научной специализированной литературы

Разделы:

- ◆ Акушерство и гинекология
- ◆ Анестезиология и реаниматология
- ◆ Биология и биохимия
- ◆ Генетика
- ◆ Детские книги
- ◆ Для широкого круга читателей
- ◆ Инфекции
- ◆ Колопроктология
- ◆ Онкология
- ◆ Ортопедия, травматология, физическая культура
- ◆ Офтальмология
- ◆ Патологоанатомия
- ◆ Педиатрия, неонатология
- ◆ Психология
- ◆ Стоматология
- ◆ Техносферная безопасность
- ◆ Урология
- ◆ Физика
- ◆ Фитотерапия
- ◆ Хирургия
- ◆ Эпилептология

