

---

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ  
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

---

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

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

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

<sup>a</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, пр-т акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>b</sup>Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>c</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук, Набережная р. Ушайки, 10, Томск, 634050 Россия

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

Поступила в редакцию 08.07.2023 г.

После доработки 09.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

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

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

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

## ВВЕДЕНИЕ

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

Генные мутации и делеции гена *UBE2A* могут вызывать редкое генетическое заболевание — синдром Насименто у мужчин, влияющий как на умственное развитие, так и на фенотипические признаки (Nascimento et al., 2006, Thunstrom et al., 2015). Женщины-носительницы делеций, включающих ген *UBE2A*, обычно здоровы, но имеют экстремально смещенную инактивацию X-хро-

мосомы. У пациентов-носителей делеции, помимо серьезной степени умственной отсталости, наблюдаются пороки сердца и мочеполовой системы (Thunstrom et al., 2015). Влияние делеции Xq24 на эмбриолетальность было описано нами в предыдущей работе (Tolmacheva et al., 2020).

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

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Получение ИПСК и условия культивирования*

Фибробласты были получены от пациентки с микроделецией в Xq24, затрагивающей ген *UBE2A* (Tolmacheva et al., 2020). Фибробласты TAF15 выделяли и культивировали как описано ранее (Nikitina et al., 2018a, 2018b). Для репрограммирования фибробластов использовали электропорацию набором эписомных векторов (по 500 нг каждого), кодирующих OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28, mp53DD и EGFP (Okita et al., 2013) с помощью Neon Transfection System с параметрами 1650 В, 10 мс, три импульса (Thermo Fisher Scientific). В течение недели клетки культивировали в среде для фибробластов, затем пересаживали на инактивированные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидер) в среду на основе нокаутного заменителя сыворотки и FGF2 человека (Chechetkina et al., 2022). Колонии ИПСК пересаживали механически с добавлением в день пересадки ингибитора Rho-ассоциированной протеин киназы Y-27632 (Abcam). Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

*Выделение ДНК и РНК*

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

*ПЦР, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ*

Детекцию контаминации микоплазмой (Chopra et al., 1998) и присутствия эписом ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/epi5\\_episomal\\_ipsc\\_reprogramming\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/epi5_episomal_ipsc_reprogramming_man.pdf)) в клетках проводили с помощью ПЦР. ПЦР проводили на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-TaQ (2×) (Biolabmix). Для подтверждения плюрипотентности использовали ОТ-ПЦР (Huangfu et al., 2008). Для синтеза кДНК из 0.5 мкг РНК использовали ревертазу М-MuLV (Biolabmix). Для подтверждения делеции использовали ПЦР-РВ на гены *UBE2A* и *SEPTIN6*, локализованные в области делеции, а также на контрольный ген *HEXB* (Tolmacheva et al., 2020). Последовательности праймеров для выявления микоплазмы, эписом, подтверждения делеции, анализа экспрессии генов-маркеров плюрипотентности и дифференцировки в производные трех зародышевых листков приведены в табл. 1.

*Кариотипирование*

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

*Спонтанная дифференцировка in vitro*

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

*Иммунофлуоресцентное окрашивание*

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

*STR-анализ*

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Получение и характеристика клеточной линии*

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

## ОБСУЖДЕНИЕ

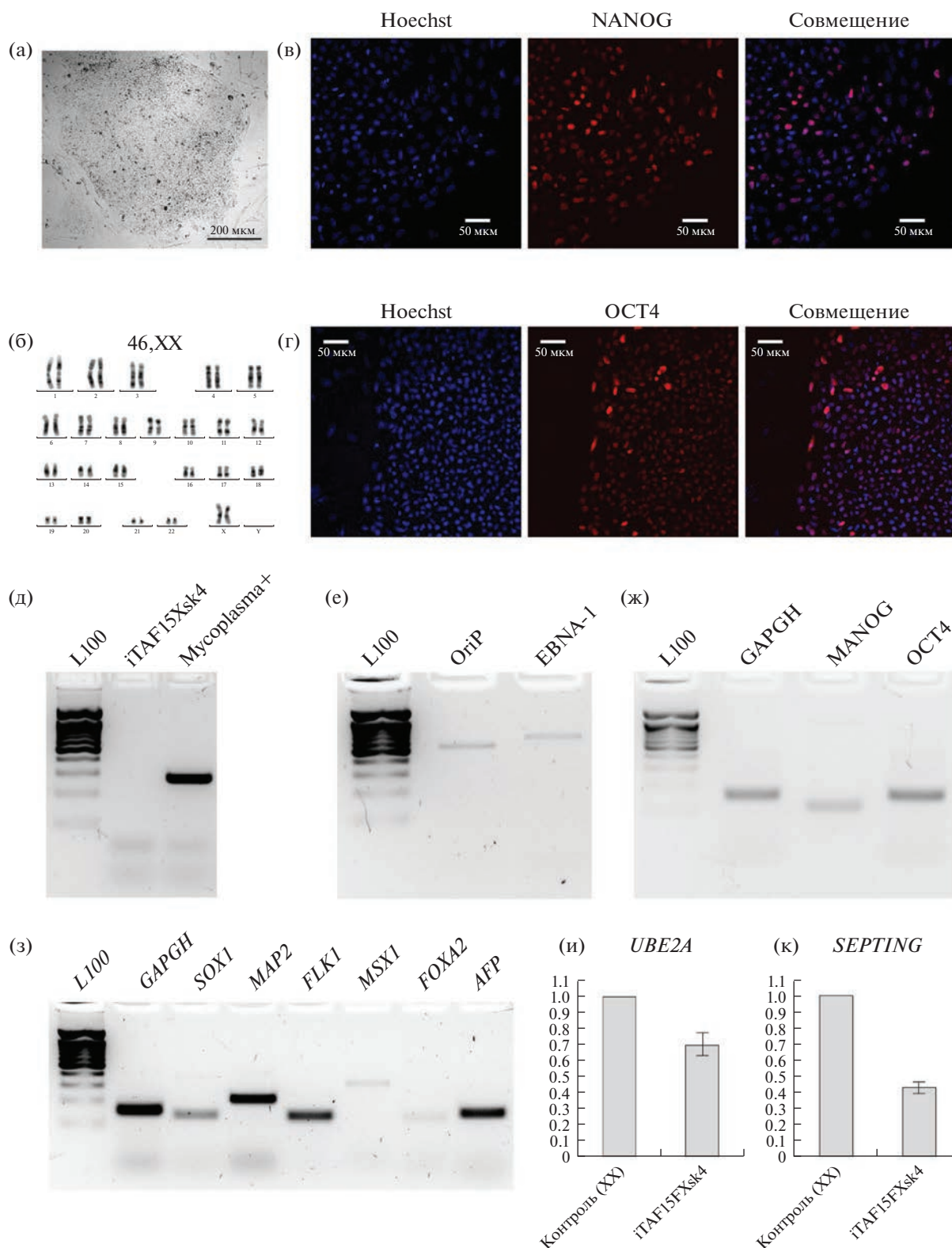
ИПСК линии iTAF15Xsk4 имеют морфологию эмбриональных стволовых клеток человека и плюрипотентны. Мы использовали неинтегриру-

Таблица 1. Антитела и праймеры

|                                                 | Антитела                                     |                 |                                                               |                   |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|
|                                                 | Антитело                                     | Разведение      | Производитель, кат. №                                         | RRID              |
| Маркеры плюрипотентности                        | Rabbit anti-OCT4                             | 1 : 500         | Cell Signalling, 2750                                         | RRID: AB_823583   |
|                                                 | Rabbit anti-NANOG                            | 1 : 500         | Cell Signaling, 4903                                          | RRID: AB_10559205 |
| Вторичные антитела                              | Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 546 | 1 : 200         | Thermo Fisher Scientific, A-11010                             | RRID: AB_2534077  |
|                                                 | Праймеры                                     |                 |                                                               |                   |
|                                                 | Ген/локус                                    | Размер продукта | Прямой/обратный праймер (5'–3')                               |                   |
| Детекция эписомных векторов                     | <i>oriP</i>                                  | 544 п.н.        | TTCCACGAGGGTAGTGAACC/<br>TCGGGGGTGTTAGAGACAAC                 |                   |
| Детекция эписомных векторов                     | <i>EBNA-1</i>                                | 666 п.н.        | ATCGTCAAAGCTGCACACAG/<br>CCCAGGAGTCCCAGTAGTCA                 |                   |
| Детекция микоплазмы                             | <i>Myco1</i>                                 | 280 п.н.        | GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/<br>TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC     |                   |
| Детекция микоплазмы                             | <i>Myco2</i>                                 | 206 п.н.        | GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC/<br>GGTTATTCGATTTCTAAATCGCCT         |                   |
| Детекция микоплазмы                             | <i>Myco3</i>                                 | 170 п.н.        | ATACATGCATGTGCGAGCGAG/<br>CATCTTTTAGTGGCGCCTTAC               |                   |
| Детекция микоплазмы                             | <i>Myco4</i>                                 | 407 п.н.        | CATGCAAGTCGGACGAAGCA/<br>AGCATTCCTCTTCTTACAA                  |                   |
| Подтверждение делеции, контрольный ген (ПЦР-РВ) | <i>HEXB</i>                                  | 136 п.н.        | CCGGGCACAATAGTTGAAGT/<br>TCCTCCAATCTTGTCCATAGC                |                   |
| Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)                  | <i>UBE2A</i>                                 | 92 п.н.         | CAAAGCTGGCGTGATTGTTG/<br>GGAGTAGGGAGGTGACAAACA                |                   |
| Подтверждение делеции (ПЦР-РВ)                  | <i>SEPTIN6</i>                               | 112 п.н.        | GACACCCTGTTCAACACCAAA/<br>GCTTTAGCCTCACGTTGCTC                |                   |
| Ген домашнего хозяйства                         | <i>GAPDH</i>                                 | 153 п.н.        | GTGGACCTGACCTGCCGTCT/<br>GGAGGAGTGGGTGTGCTGT                  |                   |
| Маркер плюрипотентности                         | <i>NANOG</i>                                 | 110 п.н.        | AAAGAATCTTCACCTATGCC/<br>GAAGGAAGAGGAGAGACAGT                 |                   |
| Маркер плюрипотентности                         | <i>OCT4</i>                                  | 128 п.н.        | CTGGGTTGATCCTCGGACCT/<br>CACAGAACTCATACGGCGGG                 |                   |
| Маркер эктодермы                                | <i>SOX1</i>                                  | 133 п.н.        | CACAACCTCGGAGATCAGCAA/<br>GGTACTTGTAATCCGGGTGC                |                   |
| Маркер эктодермы                                | <i>MAP2</i>                                  | 212 п.н.        | CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG/<br>CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG |                   |
| Маркер мезодермы                                | <i>FLK1</i>                                  | 131 п.н.        | TGATCGGAAATGACACTGGA/<br>CACGACTCCATGTTGGTCAC                 |                   |
| Маркер мезодермы                                | <i>MSX1</i>                                  | 307 п.н.        | CGAGAGGACCCCGTGATGCAGAG/<br>GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG          |                   |
| Маркер энтодермы                                | <i>FOXA2</i>                                 | 122 п.н.        | GGAGCGGTGAAGATGGAA/<br>TACGTGTTTCATGCCGTTTCAT                 |                   |
| Маркер энтодермы                                | <i>AFP</i>                                   | 136 п.н.        | AAATGCGTTTCTCGTTGCTT/<br>GCCACAGGCCAATAGTTTGT                 |                   |

Таблица 2. Паспорт линии ИПСК iTAF15Xsk4

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



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

Таблица 3. Характеристика линии ИПСК человека iTAF15Xsk4

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

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

Полученную линию ИСПК в дальнейшем можно будет использовать для изучения эффекта делеции гена *UBE2A*. Также, потенциально, ИПСК можно использовать для изучения инактивации X-хромосомы. Для этого будет необходимо перевести клетки на стадию наивной плюрипотентности, хотя в некоторых работах показана неслучайная инактивация X-хромосом при дифференцировке “наивных” ИПСК. Также, нужно будет проверить клетки на наличие эрозии инактивации

X-хромосом. Из-за того, что эрозия сохраняется в дифференцированных клетках, линии с эродированной инактивацией X-хромосомы непригодны для изучения механизмов X-инактивации (Zhou et al., 2023).

БЛАГОДАРНОСТИ

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

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chechetkina S.A., Khabarova A.A., Chvileva A.S. et al.* Generation of two iPSC lines from healthy donor with a heterozygous mutation in the VPS13B gene // *Stem. Cell Res.* 2021. V. 59. P. 102648.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102648>
- Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C. et al.* Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome // *Mol. Cell Probes.* 1998. V. 12. № 5. P. 301–308.  
<https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0186>
- Drozd A.M., Walczak M.P., Piaskowski S. et al.* Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system // *Stem. Cell Res. Ther.* 2015. V. 6. № 1. P. 122.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0112-3>
- Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1269–1275.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.1502>
- Nascimento R.M.P., Otto P.A., de Brouwer A.P.M. et al.* UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 79. № 3. P. 549–555.  
<https://doi.org/10.1086/507047>
- Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Generation of two iPSC lines (IMGTi001-A and IMGTi001-B) from human skin fibroblasts with ring chromosome 22 // *Stem. Cell Res.* 2018a. V. 31. P. 244–248.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.08.012>
- Nikitina T.V., Menzorov A.G., Kashevarova A.A. et al.* Induced pluripotent stem cell line, IMGTi003-A, derived from skin fibroblasts of an intellectually disabled patient with ring chromosome 13 // *Stem. Cell Res.* 2018b. V. 33. P. 260–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.11.009>
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y. et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 3. P. 458–466.  
<https://doi.org/10.1002/stem.1293>
- Prokhorovich M.A., Lagar'kova M.A., Shilov A.G. et al.* Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. V. 144. № 1. P. 126–129.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0271-z>
- Shneider T.A., Pristiyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. et al.* Generation of four iPSC lines from two siblings with a microdeletion at the CNTN6 gene and intellectual disability // *Stem. Cell Res.* 2019. V. 41. P. 101591.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101591>
- Thunstrom S., Sodermark L., Ivarsson L. et al.* UBE2A deficiency syndrome: a report of two unrelated cases with large Xq24 deletions encompassing UBE2A gene // *Am. J. Med. Genet. A.* 2015. V. 167A. № 1. P. 204–210.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36800>
- Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P. et al.* Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from UBE2A deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // *Cytogenet. Genome Res.* 2020. V. 160. № 5. P. 245–254.  
<https://doi.org/10.1159/000508050>
- Zhou J., Hu J., Wang Y. et al.* Induction and application of human naive pluripotency // *Cell Rep.* 2023. V. 42. № 4. P. 112379.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112379>

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

I. E. Pristyazhnyuk<sup>1</sup>, N. I. Meshcheryakov<sup>1, 2</sup>, T. V. Nikitina<sup>3</sup>, A. A. Kashevarova<sup>3</sup>, D. A. Fedotov<sup>3</sup>, E. N. Tolmacheva<sup>3</sup>, L. I. Minaycheva<sup>3</sup>, L. P. Nazarenko<sup>3</sup>, I. N. Lebedev<sup>3</sup>, and A. G. Menzorov<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>3</sup>*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk, 634050 Russia*

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

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

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