

На правах рукописи

ЖИВЕНЬ МАРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *HIF2A* В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

1.5.7. – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) в лаборатории эпигенетики развития г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Захарова Ирина Сергеевна
кандидат биологических наук, научный сотрудник
лаборатории эпигенетики развития
Института цитологии и генетики СО РАН

**Официальные
оппоненты:**

Салмина Алла Борисовна
доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник и заведующий
Лабораторией экспериментальной
нейроцитологии Отдела исследований мозга
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научный центр
неврологии», г.Москва

Кулемзин Сергей Викторович
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории
иммуногенетики Института молекулярной и
клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, г. Новосибирск

**Ведущее
учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического
Агентства России".

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел +7 (383) 3634906, факс +7 (383) 3331278.
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В процессе развития у многоклеточных организмов сформировались системы регуляции гомеостатического баланса кислорода в тканях. В результате возникли комплексы, реагирующие на гипоксические условия (пониженную концентрацию кислорода в клетках и тканях: от 1 до 5 %) (Semenza *et al.*, 2003). Факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs), являются ключевыми регуляторами клеточного ответа на гипоксическое воздействие у млекопитающих, которые способствуют активации ряда транскрипционных факторов, играя важную роль в управлении механизмами гликолиза, ангиогенеза, эритропоэза, поддержания сосудистого тонуса и клеточной выживаемости (Prabhakar and Semenza, 2012). По своей структуре HIFs – гетеродимеры, образованные двумя кислород-регулируемыми субъединицами HIF1A и HIF2A и конститутивно экспрессирующейся субъединицей HIF-1 β (Hashimoto and Shibasaki, 2015). Стабильность HIFs регулируется кислород-зависимым и кислород-независимым путями (Hashimoto and Shibasaki, 2015). На данный момент существуют несколько направлений клинических исследований, связанных с изучением роли HIF-сигнального пути в патологических процессах. Было показано, что в клетках опухолей большинства типов рака человека детектируется повышенный уровень экспрессии HIFs (Talks *et al.*, 2000), а также их генов-мишеней, вовлеченных в регуляцию механизмов ангиогенеза, метаболизма глюкозы, инвазию и метастазирование (Semenza *et al.*, 2003; Mazurier, Pages *et al.*, 2012). Таким образом, ключевой задачей в терапии при онкологических заболеваниях является снижение уровня экспрессии HIFs для ингибирования избыточного ангиогенеза в тканях опухолей. Методы терапевтической модуляции HIF-сигнального пути для лечения сердечно-сосудистых заболеваний являются еще одним направлением исследований на сегодняшний день. Ключевая цель данной стратегии состоит в активации HIFs, а также факторов роста, вовлеченных в процессы ангиогенеза для эффективного лечения ишемических заболеваний (Hashimoto and Shibasaki, 2015).

В данной работе в качестве перспективного способа терапевтического ангиогенеза рассматривается активация *HIF2A* с помощью сайленсинга его ингибитора *EIF3E* в нормоксических условиях в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК). Снижение уровня экспрессии *EIF3E* замедляет деградацию HIF2A и стабилизирует его в ядрах, что приводит к индукции экспрессии ряда генов, задействованных в механизмах пролиферации и поддержания плюрипотентных свойств ЭСК человека. Кроме того, определенный уровень сайленсинга *EIF3E* в эндотелиальных производных ЭСК способствует индукции процессов ангиогенеза в нормоксических условиях. Полученные эндотелиальные производные генетически модифицированных ЭСК найдут широкое применение в качестве модели для изучения механизмов HIF-сигнального пути, а также могут стать неограниченным источником

эндотелиоцитов с повышенным регенеративным потенциалом для разработки методов терапевтического ангиогенеза.

Цель исследования - получение генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией *HIF2A* и их дифференцированных эндотелиальных производных.

Задачи исследования:

1. Получить генетически модифицированные линии ЭСК человека с нокаутом гена *EIF3E* (ингибитора *HIF2A*) посредством системы CRISPR/Cas9.
2. В полученных генетически модифицированных субклонах подтвердить сохранение плюрипотентных свойств, жизнеспособности и нормального кариотипа.
3. Проанализировать уровень экспрессии генов *EIF3E*, *HIF1A* и *HIF2A* в полученных генетически модифицированных линиях ЭСК.
4. Оценить экспрессию генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека.
5. Провести направленную дифференцировку ЭСК с делецией *EIF3E* в эндотелиальные клетки и охарактеризовать полученные клеточные популяции.
6. Оценить ангиогенные свойства полученных эндотелиальных производных в тесте *in vitro*.

Научная новизна работы. В данной работе впервые были получены генетически модифицированные линии ЭСК человека с CRISPR/Cas9-опосредованной делецией участка одного аллеля гена *EIF3E* – ингибитора *HIF2A*. В полученных субклонах подтверждена повышенная экспрессия гена *HIF2A* в нормоксических условиях. Впервые показано, что эндотелиальные производные ЭСК человека, стабильно экспрессирующие *HIF2A*, проявляют повышенную эффективность мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки, а также обладают ангиогенным потенциалом в тестах *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования внесут вклад в понимание фундаментальных молекулярных механизмов HIF-зависимого ангиогенеза, расширят представления о сигнальных каскадах, вовлекаемых при активации HIFs. Кроме того, полученные данные необходимы для разработки эффективных стратегий модуляции экспрессии HIFs для терапевтического ангиогенеза и лечения ряда онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту:

1. Супрессия активности гена *EIF3E* с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 повышает уровень экспрессии гена *HIF2A* в

эмбриональных стволовых клетках человека и их способность к мезодермальной и эндотелиальной дифференцировке.

2. Супрессия активности гена *EIF3E* в эмбриональных стволовых клетках человека повышает в эндотелиальных производных эффективность формирования трехмерных капилляроподобных структур на матрикеле *in vitro* и экспрессию проангиогенных факторов: *ANG1*, *bFGF*, *VEGFR2*, *VEGF* и *CXCR4*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих российских конференциях с международным участием: VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Open Bio, г. Кольцово, 2019; Международный конгресс CRISPR 2018, г. Новосибирск. По материалам диссертации опубликовано три работы в рецензируемых научных журналах из списка ВАК, а также две главы в монографиях.

Вклад автора. Все основные этапы работы выполнены автором самостоятельно: получение ЭСК человека с делецией гена *EIF3E* с помощью системы CRISPR/Cas9, проведение анализа экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* в полученных субклонах ЭСК человека, проведение мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки субклонов с повышенной экспрессией *HIF2A* и исходных линий HuES9 и ESM04. Осуществлена оценка морфологических и функциональных свойств полученных эндотелиальных производных. Анализ кариотипа субклонов Н9 и Е12 выполнен в Медико-генетическом центре (Генетической клинике) Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» врачом-цитогенетиком Тарховой Н.Б. Результаты Вестерн-блот анализа количества белка HIF2A предоставлены Ступниковой Аленой Сергеевной и Байрамовой Дарьей Олеговной.

Структура и объем работы. Диссертационная работа представлена на 127 страницах и состоит из введения и четырех глав: обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, оглавления, списка сокращений и библиографического списка из 170 источников. Работа проиллюстрирована 31 рисунком и содержит 11 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В работе использовали линии ЭСК человека HuES9 (Cowan *et al.*, 2004) и ESM04 (Lagarkova *et al.*, 2006; Prokhorovich *et al.*, 2007), клетки которых имеют нормальный кариотип, демонстрируют наличие маркеров плюрипотентности и маркеров трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке. Культивирование проводили на подложке митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ), либо на

культуральном пластике, покрытом матригелем. Кроме того, культивирование клеточных популяций ЭСК проводили в условиях псевдогипоксии (обработка клеток известными веществами-миметиками гипоксии: хлоридом кобальта (CoCl₂) и диметилноксалилглицином (DMOG), а также в условиях реальной гипоксии при культивировании в инкубаторе с пониженным содержанием кислорода (5%) (Живень и др., 2020).

Методы получения генетически модифицированных линий ЭСК, экспрессирующих *HIF2A*. Для эффективного нокаута *EIF3E* воспользовались системой редактирования генома CRISPR/Cas9 для удаления промоторной области и участка первого экзона с захватом точки начала транскрипции. Выбор последовательностей направляющих РНК был осуществлен с помощью программы MIT CRISPR Design Tool: <http://crispr.mit.edu>. Выбранные последовательности направляющих РНК клонировали в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP(pX458), содержащую нуклеазу Cas9 и маркерный белок GFP. Верификация последовательностей направляющих РНК в составе плазмиды была осуществлена секвенированием (ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН)). Доставку векторов в ЭСК человека выполняли на приборе Neon® Transfection System (Invitrogen Life Technologies, МРК5000). Сортинг GFP-позитивных клеток, содержащих целевые конструкции, был проведен методом проточной цитофлуориметрии на приборе BioRad S3 (Bio-Rad).

Направленная дифференцировка ЭСК в мезодермальном и эндотелиальном направлении. Направленную дифференцировку ЭСК в мезодермальные и эндотелиальные производные проводили согласно протоколу (Gu, 2018). На восьмой день дифференцировки полученную популяцию эндотелиальных производных обогатили CD 31-позитивными клетками методом магнитного сортирования согласно протоколу фирмы – производителя (Miltenyi Biotec).

Молекулярно-генетические методы характеристики ЭСК и эндотелиальных производных. Первичный анализ делеции гена *EIF3E* был осуществлен с помощью качественной ПЦР на амплификаторе PCR System 9700 (GeneAmp®) с последующей визуализацией ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле. Анализ ПЦР-продуктов для подтверждения наличия целевой делеции был проведен с помощью секвенирования в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Оценка экспрессии генов плюрипотентности, генов ферментов гликолиза и ферментов окислительных процессов митохондрий, а также генов эндотелиальных и ангиокринных факторов выполнена с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* был проведен методом цифровой ПЦР в каплях. Детекция количества белкового продукта осуществлялась Вестерн-блот анализом.

Иммунофлуоресцентное окрашивание ЭСК человека и их эндотелиальных производных. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами на маркеры плюрипотентности осуществлялось стандартным способом (Medvedev *et al.*, 2011). Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами на эндотелиальные маркеры осуществлялось по протоколам фирм-производителей.

Статистическая обработка данных. Для анализа полученных результатов qRT-PCR применяли 2^{-ΔΔCT} метод (Livak and Schmittgen, 2001). Кроме того, для

статистической оценки достоверности результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе Microsoft Excel 2007. Также для оценки достоверности различий полученных данных проточной цитометрии применяли критерий Хи-квадрат. Данные цифровой ПЦР в каплях обрабатывали и анализировали с помощью программы Quanta Soft™ Software Version 1.7.4.0917. Для анализа данных экспрессии референсных генов в нормоксических и гипоксических условиях использовали программу geNorm (Vandesompele et al., 2002). Оценка длины капилляроподобных структур эндотелиальных производных проводилась с помощью программы AngioTool (Zudaire et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение генетически модифицированных линий ЭСК, экспрессирующих *HIF2A*. Были подобраны две последовательности направляющих РНК на ген *EIF3E* таким образом, чтобы делеция (Δ) составляла 220 п.н. и включала участок промотора и начало первого экзона. Подобранные последовательности направляющих РНК были клонированы в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP(pX458), кодирующую нуклеазу Cas9 и маркерный белок GFP. Для верификации последовательностей направляющих РНК в составе векторных конструкций проведены реакции секвенирования плазмидной ДНК. Доставку двух векторов, включающих последовательности направляющих РНК и нуклеазу Cas9, проводили с помощью нуклеофекции на приборе Neon® Transfection System (ThermoScientific). Через 24-48 часов проводили сортировку GFP-позитивных клеток, содержащих целевые конструкции, методом проточной цитометрии на приборе S3 (BioRad). В результате было получено 18 % GFP-позитивных клеток, которые содержат целевые конструкции. В результате механического субклонирования сортированных клеток было получено 43 субклона ЭСК линий NuES9 и ESM04.

2. Первичный скрининг субклонов с помощью ПЦР с последующим секвенированием. В результате анализа при первичном скрининге выявлено 2 субклона Н8 и Н9 линии NuES9, а также 1 субклон линии ESM04 (рис. 1). Полученные субклоны являются гетерозиготными по целевой делеции. Данные подтверждены секвенированием (рис. 2). Во втором аллеле гена *EIF3E* в полученных субклонах также детектируются участки с делецией размером 7 п.н. (Н9), 2 п.н. (Е12), 8 п.н. (Н8) в промоторном районе (рис. 3).

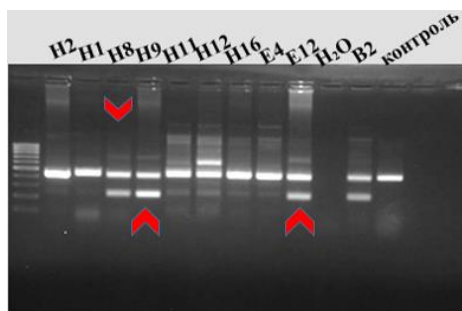


Рисунок 1. Первичный скрининг полученных субклонов. Анализ района *EIF3E* в полученных субклонах. Наличие делетированного района *EIF3E* в субклонах Н8, Н9, Е12 с пары праймеров 4F/5R, контроль – NuES9 без делеции, В2 – контрольный субклон ИПСК с делецией *EIF3E*, ранее полученный в лаборатории (Живень и др., 2018).

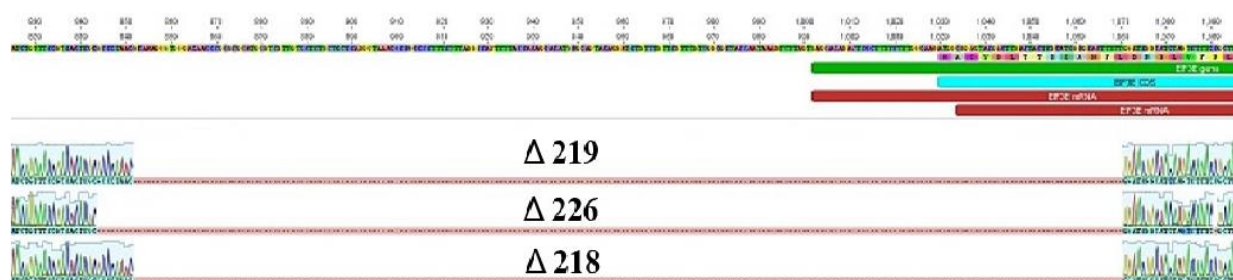


Рисунок 2. Секвенограмма области с делецией (Δ) гена *EIF3E* с размером 219 п.н. (H9), Размер делеции (Δ) субклона H8 составляет 218 п.н., субклона E12 (Δ) – 226 п.н.

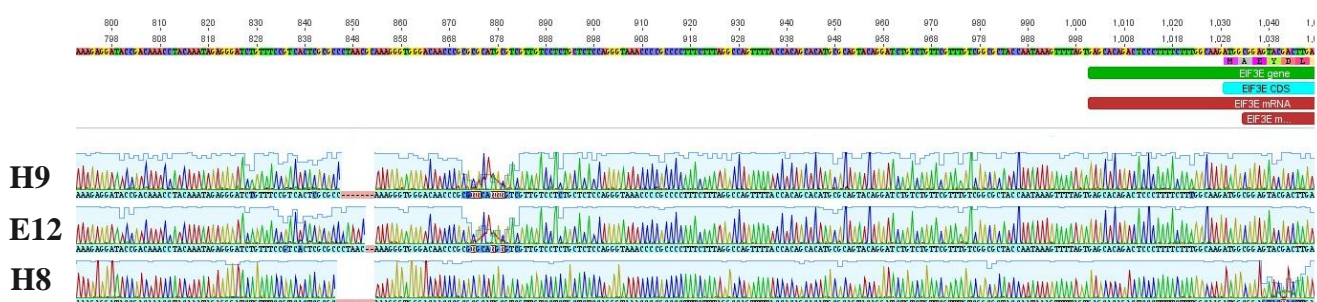


Рисунок 3. Секвенограмма области с минимальной делецией (Δ , п.н.) участка одного из аллелей *EIF3E* в субклонах H9, E12, H8.

3. Характеристика субклонов H9 и E12 линий NuES9 и ESM04 с делецией участка гена *EIF3E*. Субклоны с делецией промоторного района и участка первого экзона гена *EIF3E* линий NuES9 и ESM04 демонстрируют экспрессию характерных маркеров плюрипотентности (рис. 4). Кроме того, полученные субклоны с делецией H9 и E12 обладают нормальным хромосомным набором 46, XX и сохраняют жизнеспособность и пролиферативный потенциал. Такие клетки можно рассматривать в качестве подходящих источников для получения эндотелиальных производных в дальнейших экспериментах.

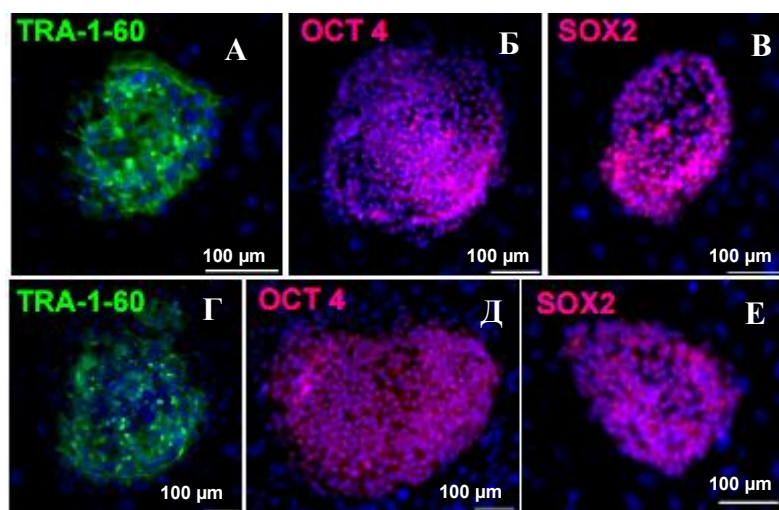


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание генетически модифицированных ЭСК человека линий HUES9 и ESM04 антителами к маркерам плюрипотентности (зеленый и красный сигнал), ядра окрашены DAPI (синий сигнал): А-В – субклон Н9, Г-Е – субклон Е12.

4. Оценка уровня экспрессии генов *EIF3E*, *HIF1A* и *HIF2A* в полученных генетически модифицированных линиях ЭСК. Для того, чтобы оценить функциональную эффективность делеции гена *EIF3E* на модуляцию экспрессии *HIF2A* в полученных субклонах ЭСК, а также эффект воздействия гипоксических и псевдогипоксических условий на экспрессию *HIF1A* и *HIF2A*, использовали цифровую ПЦР в каплях. В данном исследовании для нормирования использовали TFRC в качестве референсного гена, экспрессия которого стабильна в гипоксических и нормоксических условиях. Было обнаружено, что уровень экспрессии *EIF3E* достоверно снижен в полученных субклонах с делецией данного гена по сравнению с контрольным образцом (рис. 5). Одновременно с этим, в субклонах Н9 линии HuES9 и E12 линии ESM04 наблюдается достоверное повышение экспрессии *HIF2A* (рис. 5). Культивирование ЭСК в псевдогипоксических условиях (с добавлением вещества DMOG) способствовало повышению уровня экспрессии *HIF2A*, а также *HIF1A* в клетках.

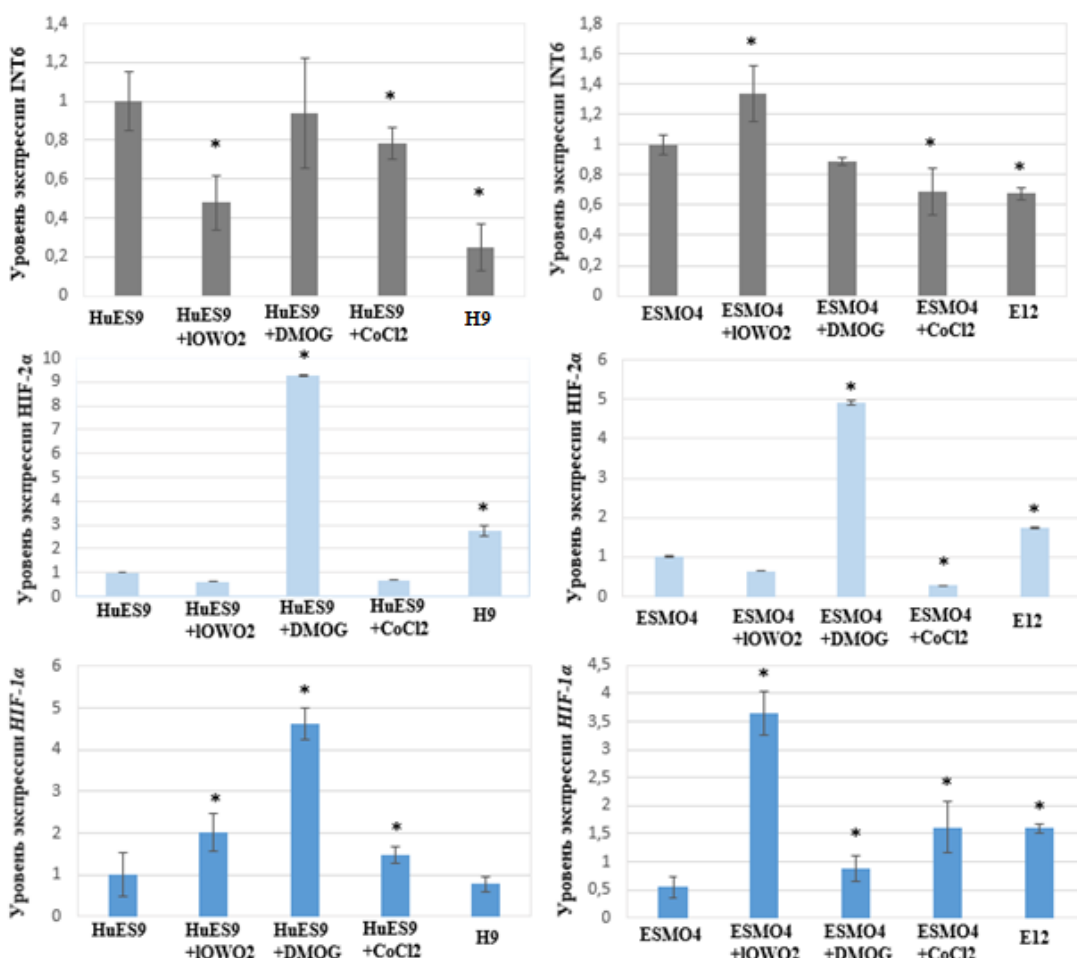


Рисунок 5. Анализ экспрессии целевых генов *EIF3E*, *HIF2A*, *HIF1A* с помощью цифровой ПЦР в каплях. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, H8 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5%O₂). Уровень экспрессии гена *EIF3E* достоверно снижен в субклонах с делецией данного гена, по сравнению с исходной линией ЭСК. В субклонах H9 и E12 наблюдается повышение экспрессии *HIF2A*, культивирование в условиях гипоксии и псевдогипоксии приводит к повышению экспрессии *HIF1A* (*) $p < 0,05$ vs исходные линии ЭСК. (n=3, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего)

5. Определение количества белка гена *EIF3E* и *HIF2A* в исследуемых линиях HuES9 и ESM04. В результате Вестерн-блот анализа было показано снижение количества белкового продукта у субклонов H9 и E12 с делецией *EIF3E*, что подтверждает полученные данные с помощью цПЦР в каплях (рис. 6, (А)). Кроме того, генетически модифицированного субклона E12 с делецией *EIF3E* обнаружили достоверное повышение уровня белка HIF2A более, чем в два раза по сравнению с контрольной линией ESM04. Культивирование в условиях гипоксии и псевдогипоксии (с применением вещества-миметика гипоксии DMOG) привело к стабилизации белка HIF2A в клетках линии ESM04. Однако не было выявлено повышение уровня HIF2A в клетках линии ESM04 при использовании хлорида кобальта (вещества-миметика гипоксии). Для субклона H9 с делецией *EIF3E* не было детектировано достоверного различия в уровне HIF2A по сравнению с контрольной линией HuES9. Кроме того, не выявлено достоверной разницы уровня белка HIF2A в клетках, культивируемых в условиях гипоксии и псевдогипоксии (с применением веществ-миметиков гипоксии), по сравнению с контрольной линией HuES9 (рис. 6, (Б)).

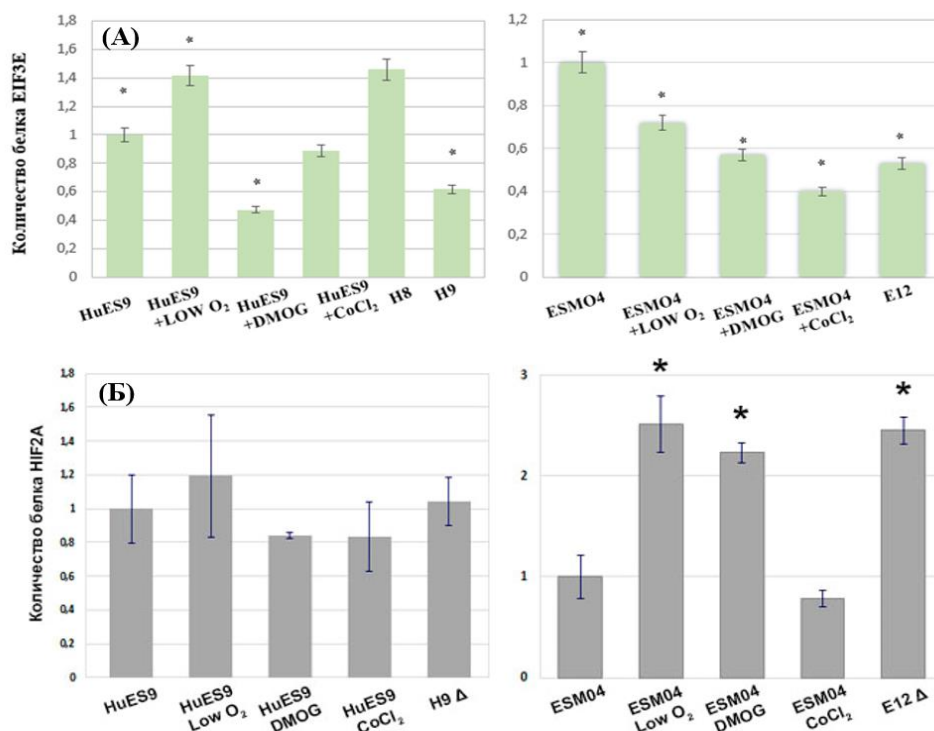


Рисунок 6. Анализ количества белкового продукта (А) EIF3E и (Б) HIF2A в исследуемых линиях ЭСК человека. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12– субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). Результаты анализа данных Вестерн-блота клеточных лизатов исследуемых линий и субклонов с помощью программы ImageJ. $p < 0,05$ (n=2, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что нокаут *EIF3E* способствует повышению уровня экспрессии *HIF2A* в полученных субклонах E12 и H9 линий ESM04 и HuES9. Предполагается, что полученные субклоны моделируют состояние клеток при длительной гипоксии. При культивировании клеток линии ESM04 в условиях гипоксического инкубатора при 5% O₂ и в условиях псевдогипоксии (после обработки CoCl₂) наблюдается ситуация, характерная для стадии адаптации к гипоксии – повышение экспрессии *HIF1A*, но не *HIF2A*. Обработка веществом-миметиком гипоксии DMOG не только вызывает повышение экспрессии *HIF1A* в ЭСК линий HuES9 и ESM04, но и приводит к повышению экспрессии *HIF2A*. Это согласуется с данными о том, что DMOG вызывает одновременную стабилизацию *HIF1A* и *HIF2A* в клетках.

6. Характеристика экспрессии генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях в исследуемых линиях ЭСК человека. Под воздействием низких концентраций кислорода (1-4% O₂) клетки претерпевают метаболическую адаптацию, при которой наблюдается подавление энергетической активности митохондрий. В этих процессах важную роль играют HIFs, которые непосредственным участием подавляют активность переноса электронов, происходит скоординированная регуляция метаболизма и переход на аэробный гликолиз (Wheaton and Chandel, 2011). В исследуемых ЭСК человека проанализированы ферменты гликолитического пути и ферменты, вовлеченные в окислительные процессы, происходящие в митохондриях (рис. 7). В данном случае обнаружено, что уровень экспрессии генов гликолитических ферментов *PDK1* и *PDHX* достоверно повышается в клетках культивируемых в гипоксических условиях, а также в субклонах E12, H9 и H8. Также в субклоне H8 повышен уровень гексокиназы *HK1*, которая переключает метаболизм с аэробного дыхания на гликолиз. При этом обработка веществами-миметиками гипоксии не вызвала значительного повышения экспрессии гликолитических ферментов. Кроме того, достоверно повышается уровень экспрессии митохондриальных ферментов, таких как митохондриальной цитохром с-оксидазы, так и НАДН-убихинон-оксидоредуктазы в субклонах E12 и H8. Из этого следует, что полученные генетически модифицированные ЭСК с повышенной экспрессией HIFs адаптировались к энергетически выгодному пути метаболизма, совместив гликолиз с последующим митохондриальным окислением пирувата.

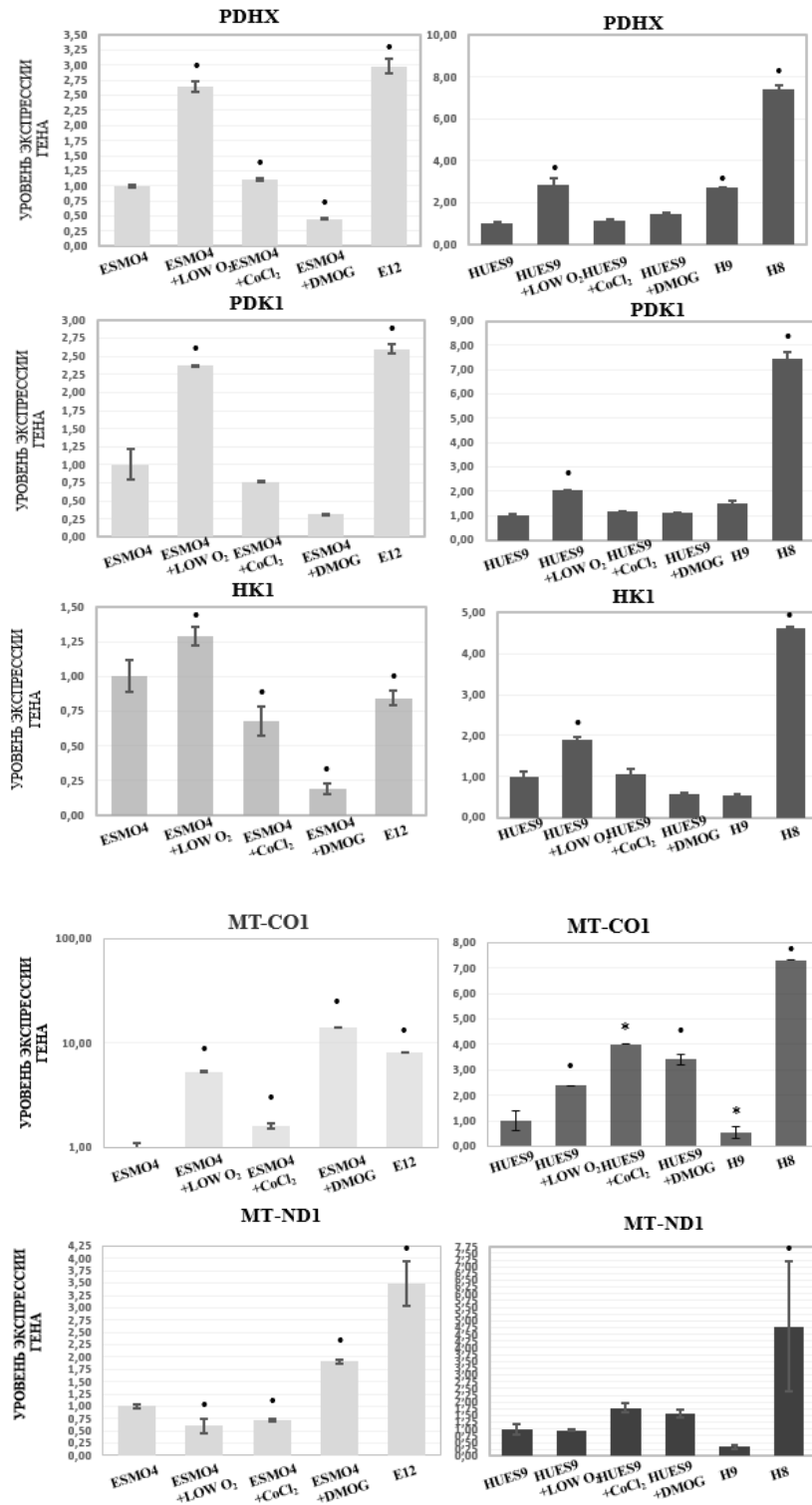


Рисунок 7. Уровень экспрессии генов, связанных с гликолизом и окислительными процессами в митохондриях, в исследуемых линиях ЭСК человека. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 и H8 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESM04+DMOG, ESM04+CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESM04 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК, культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). HK1 – hexokinase 1, PDK1 – pyruvate dehydrogenase kinase-1, PDHX – Pyruvate Dehydrogenase Complex Component X, MT-ND1 – NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1, MT-CO1 – mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I

(Cytochrome c oxidase I, COX1), (•) $p < 0,001$, (*) $p < 0,05$. ($n=4$, значения для независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего)

7. Получение и характеристика эндотелиальных производных исследуемых линий и генетически модифицированных линий ЭСК со сверхэкспрессией *HIF2A*. На начальном этапе была запущена мезодермальная дифференцировка в монослое на поверхности обработанной матригелем с применением ингибитора CHIR99021. На первом этапе для оценки эффективности дифференцировки был осуществлен анализ экспрессии первого мезодермального маркера – гена *Brachyury* с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени (рис. 8). В качестве референсного гена был использован *B2M*, который стабильно экспрессируется в условиях гипоксии и нормоксии.

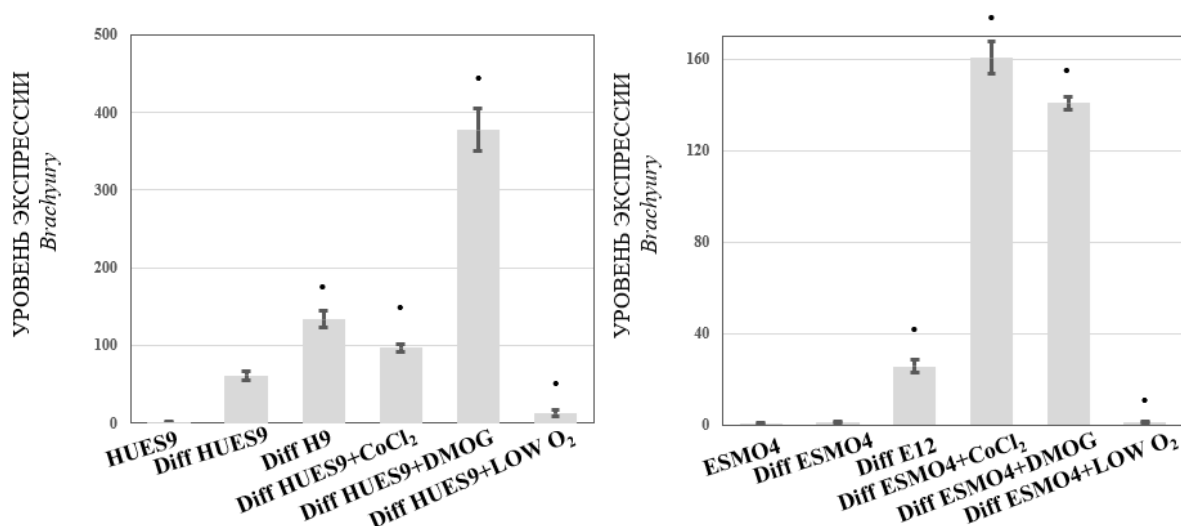


Рисунок 8. Анализ экспрессии *Brachyury* на второй день от начала мезодермальной дифференцировки с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. HuES9, ESMO4 – исходные линии ЭСК человека, H9 и E12 – субклоны с делецией *EIF3E*. HuES9+DMOG, HuES9+CoCl₂, ESMO4+DMOG, ESMO4+ CoCl₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях псевдогипоксии, ESMO4 Low O₂, HuES9 Low O₂ – линии ЭСК, культивируемые в условиях реальной гипоксии (5% O₂). (•) $p < 0,001$ в сравнении с исходной линией на второй день дифференцировки (diff HuES9/diff ESMO4). ($n=4$, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

Для субклона H9 линии HuES9 выявлено повышение экспрессии *Brachyury* более, чем в 2 раза по сравнению с исходной линией HuES9 без делеции *EIF3E*. Сходная ситуация прослеживается в субклоне E12 линии ESMO4, где уровень экспрессии *Brachyury* в 19 раз выше по сравнению с исходной линией ESMO4. Кроме того, достоверное повышение уровня экспрессии *Brachyury* показано для линий ESMO4 и HuES9 в псевдогипоксических условиях дифференцирования. Принимая во внимание данные об уровне экспрессии *HIF2A* и *HIF1A* в анализируемых линиях, можно заключить, что достоверное повышение *HIF2A* в субклонах, вызванное делецией гена *EIF3E*, приводит к достоверному

повышению маркера ранней мезодермы *Brachyury*. В случае воздействия миметика гипоксии хлорида кобальта детектируется повышение экспрессии *HIF1A*, а также достоверное повышение уровня *Brachyury*. В ответ на воздействие DMOG в ЭСК повышается не только *HIF1A*, но и *HIF2A*. Тем не менее в случае применения DMOG уровень *Brachyury* повышается достоверно и даже больше, чем в генетически модифицированных субклонах. В то же время в случае культивирования клеток в условиях гипоксического инкубатора в течение двух пассажей наблюдается достоверное повышение *HIF1A*, но не наблюдается достоверного повышения уровня экспрессии *Brachyury*. Как отмечалось ранее, в ЭСК человека повышение *HIF1A* связано с адаптацией к гипоксическому воздействию. В условиях длительной продолжающейся гипоксии *HIF1A* отключается и активируется *HIF2A*. Вероятно, обе линии ЭСК, культивируемые в гипоксическом инкубаторе, находятся в состоянии адаптации к гипоксии, и спустя два пассажа не происходит переключение на *HIF2A*. Это, в свою очередь, не вызывает достоверного повышения экспрессии *Brachyury*. То, что в случае хлорида кобальта уровень *Brachyury* выше, чем при культивировании в гипоксическом инкубаторе, может объясняться разным механизмом воздействия факторов на клетку. Таким образом, повышение экспрессии *HIF2A* путем делеции участка *EIF3E* в ЭСК человека приводит к повышению уровня экспрессии *Brachyury* в дифференцированных мезодермальных предшественниках, что свидетельствует о повышении эффективности мезодермальной дифференцировки. Модуляция уровня *HIF2A* и *HIF1A* с помощью миметиков гипоксии также повышает эффективность мезодермальной дифференцировки ЭСК.

В ходе работы методом проточной цитометрии также выполнена оценка процентного содержания характерных эндотелиальных маркеров – VEGFR2 и CD31 на второй и восьмой день эндотелиальной дифференцировки (рис. 9). Было показано, что на второй день мезодермальной дифференцировки во всех исследуемых линиях ЭСК, исключая субклон E12, процент VEGFR2-позитивных клеток достоверно повышен по сравнению с дифференцированными мезодермальными предшественниками, полученными из исходных линий. На восьмой день дифференцировки детектируется максимальное количество VEGFR2/CD31-позитивных клеток субклонов E12 и H9 с делецией *EIF3E*. Воздействие гипоксических условий (5% O₂) также способствовало эффективной дифференцировке и увеличению процентного содержания CD31-позитивных клеток на восьмой день. Однако в случае использования веществ-миметиков гипоксии эффективность эндотелиальной дифференцировки снижена. В данной ситуации, длительное применение DMOG и CoCl₂ может отрицательно воздействовать на получение эндотелиальных производных ЭСК.

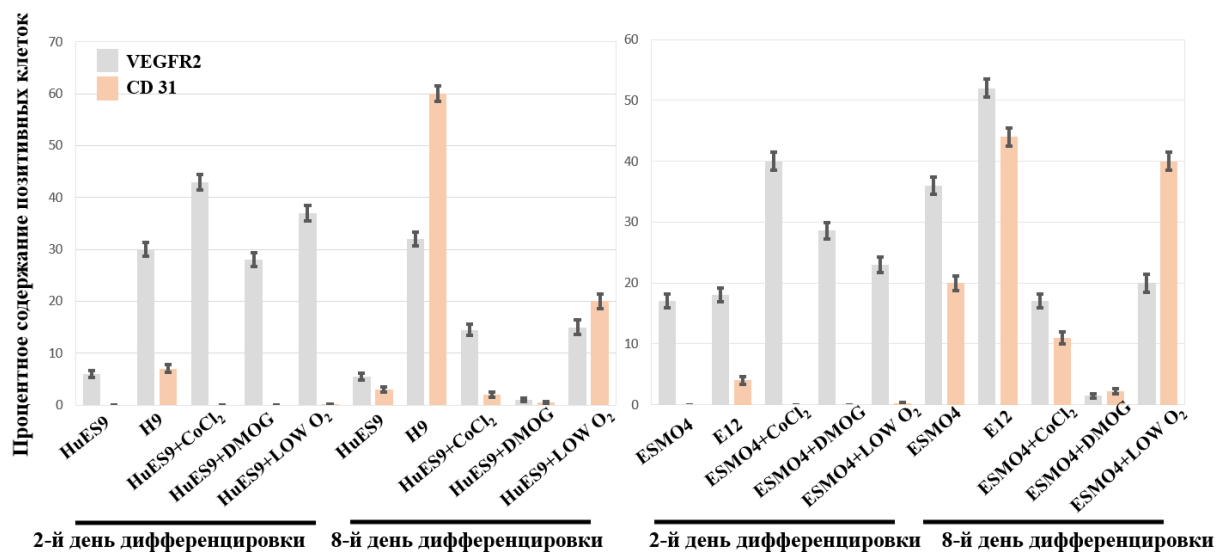


Рисунок 9. Анализ процентного содержания VEGFR2⁺ и CD31⁺ клеток в ходе дифференцировки. Оценка методом проточной цитометрии. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 – субклоны (*ΔEIF3E*). HuES9+CoCl₂, ESM04+CoCl₂, HuES9+DMOG, ESM04+ DMOG – линии ЭСК человека, обработанные веществами-миметиками гипоксии. HuES9 lowO₂, ESM04 lowO₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях гипоксии (5% O₂, 5% CO₂). (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего).

На восьмой день популяцию эндотелиальных производных ЭСК обогатили с помощью антител к CD31, конъюгированных с магнитными частицами (Miltenyi). С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показали, что эндотелиальные популяции субклонов H9 и E12 экспрессируют характерные эндотелиальные маркеры CD31 и фактор фон Виллебранда.

8. Оценка экспрессии проангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека. На восьмой день дифференцировки с помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени произведена оценка экспрессии генов ангиогенных факторов *ANG1*, *bFGF*, *VEGF*, *VEGFR2*, *CXCR4*, *SDF1* в эндотелиальных производных генетически модифицированных ЭСК, а также в ЭСК, культивируемых с использованием миметиков гипоксии и в условиях гипоксического инкубатора. Было показано, в эндотелиальных производных субклонов H9 и E12, а также линии ESM04 и HuES9 в условиях физиологической гипоксии наблюдается повышение большинства генов ангиокринных факторов по сравнению с исходными линиями (рис. 10). Однако наблюдается низкий уровень экспрессии гена *VEGFR2* в эндотелиальных производных, обработанных веществами – миметиками гипоксии: хлоридом кобальта и DMOG. Возможно, отсутствие экспрессии рецептора фактора роста эндотелия при повышенном уровне экспрессии ряда других ангиогенных факторов приводит к низкому процентному содержанию дифференцированной популяции CD31-позитивных эндотелиоцитов.

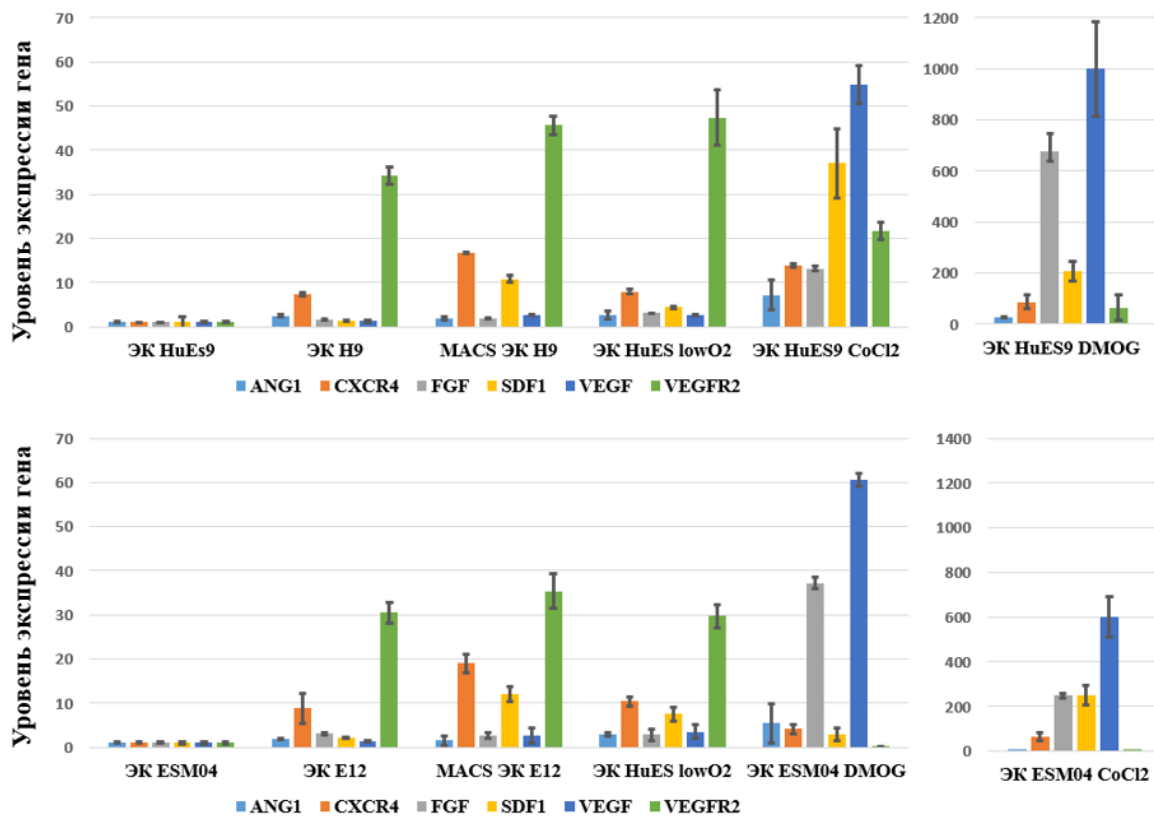


Рисунок 10. Анализ экспрессии генов ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК человека. Оценка методом ПЦР в режиме реального времени. Анализ экспрессии проводился на восьмой день дифференцировки. HuES9, ESM04 – исходные линии ЭСК человека, H9, E12 – субклоны ($\Delta EIF3E$). MACS H9, E12 – позитивные клетки, сортированные по маркеру CD31, HuES9+CoCl₂, ESM04+CoCl₂, HuES9+DMOG, ESM04+DMOG – линии ЭСК человека, обработанные веществами-миметиками гипоксии. HuES9 Low O₂, ESM04 Low O₂ – линии ЭСК человека, культивируемые в условиях гипоксии (5% O₂, 5% CO₂). (n=4, значения для технических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего).

9. Оценка функциональных свойств полученных эндотелиальных производных ЭСК человека. Было показано, что эндотелиальные производные ЭСК человека способны образовывать трехмерные капиллярноподобные структуры в толще матригеля. Функциональный анализ эндотелиальных производных был проведен после предварительного обогащения всех клеток популяцией CD31-позитивных эндотелиоцитов методом магнитного сортирования. Количественная оценка с помощью программы AngioTool показала, что общая длина сосудоподобных структур в генетически модифицированных субклонах линий HuES9 и ESM04 более, чем в три раза превышает значения для контрольных линий (рис. 11).

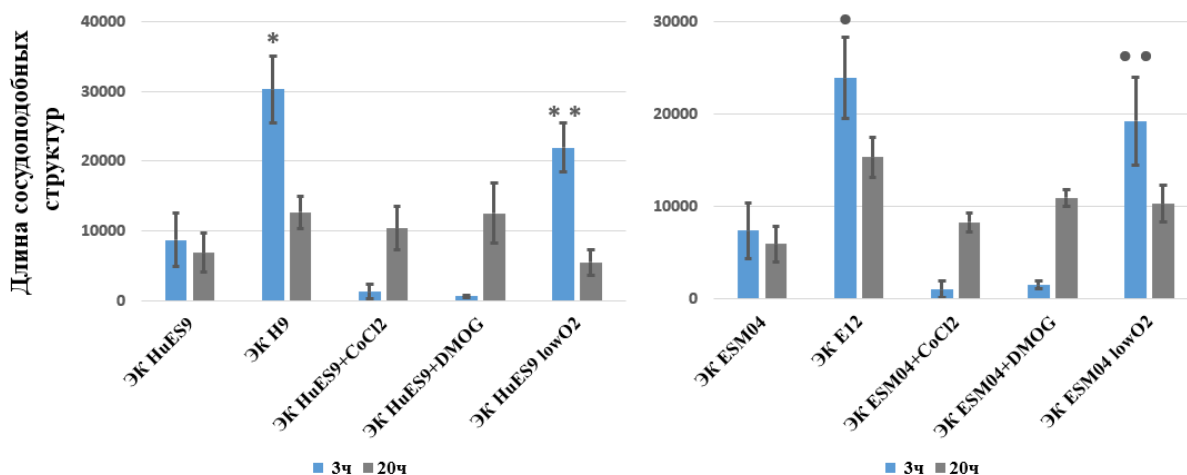


Рисунок 11. Анализ общей длины сосудоподобных структур в тесте на матрикеле *in vitro*. Анализ проводился с помощью программы Angiotool.ЭК-эндотелиальные клетки. (*) $p=2,09 \cdot 10^{-10}$ ЭК H9 vs ЭК HuES9, (**) $p=0,001$ HuES9+low O₂ vs ЭК H9, (•) $p=2,88 \cdot 10^{-6}$ ЭК E12 vs ЭК ESM04, (••) $p=0,08$ ЭК ESM04+low O₂ vs ЭК E12.

Кроме того, полученные эндотелиальные производные субклонов нарабатывают характерные для эндотелия компоненты внеклеточного матрикса: фибронектин и коллаген 4 типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность сосудов, вовлечены в регуляцию сосудистого тонуса, задействованы в процессах перемещения клеток иммунной системы, транспорта питательных веществ и кислорода к клеткам, восстановлении поврежденных тканей. Также известно, что эндотелиальные клетки играют важную роль в патологических изменениях сосудов: сосудистой проницаемости, увеличении адгезии между эндотелием и лимфоцитами, что приводит к формированию инфильтрата в кровеносном русле и стенозу сосудов. В таких условиях эндотелий отвечает за снижение концентрации кислорода посредством механизмов HIF-сигнального пути. Модуляция экспрессии *HIF2A* является перспективной терапевтической стратегией для управления онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Однако остается актуальным вопрос поиска оптимальных методов эффективной регуляции *HIF2A*. В данной работе была использована система геномного редактирования CRISPR/Cas9 в качестве эффективного способа сайленсинга *EIF3E* – главного регулятора *HIF2A* в ЭСК человека. Было показано, что полученные субклоны генетически модифицированных ЭСК обладают повышенной экспрессией *HIF2A* в нормоксических условиях. Эндотелиальные производные полученных субклонов демонстрируют повышенную эффективность мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки по сравнению с исходной клеточной линией. Кроме того, в

тестах *in vitro* полученные эндотелиальные производные проявляют ангиогенный потенциал. Сверхэкспрессия *HIF2A* в эмбриональных стволовых клетках человека стабилизирует экспрессию характерных генов плюрипотентности, а также способствует повышению эффективной эндотелиальной дифференцировки. Полученные эндотелиальные производные обладают повышенным ангиогенным потенциалом в тестах *in vitro*. Таким образом, эндотелиальные производные могут стать оптимальным клеточным источником для терапевтической трансплантации в область ишемического поражения, а также перспективной моделью для изучения процессов эмбрионального развития человека и скрининга фармакологических препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Получены генетически модифицированные ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E*. Делеции участка одного аллеля в полученных субклонах составляют 219 п.н., 218 п.н., 226 п.н. и включают участок промоторной области и начало первого экзона; делеции участка второго аллеля составляют 7 п.н., 8 п.н., 2 п.н. соответственно и включают участок промоторного района. В полученных субклонах выявляется снижение уровня мРНК и белка *EIF3E*.
2. Полученные генетически модифицированные ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E* сохраняют плюрипотентные свойства, имеют нормальный кариотип и жизнеспособность.
3. Делеция участка гена *EIF3E* в субклоне Н9 (Δ 219 п.н.) линии NuES9 вызывает достоверное повышение мРНК *HIF2A*, но не вызывает увеличения уровня белка. В субклоне E12 линии ESM04 с делецией (Δ 226 п.н.) детектируется повышение экспрессии мРНК и белка *HIF2A* и мРНК *HIF1A*.
4. Наличие стабильного белка *HIF2A* в субклоне E12 вызывает повышение экспрессии генов гликолитического пути (*PDHX*, *PDK1*) и митохондриального окисления (*MT-ND1*, *MT-CO1*), что может быть связано с совмещением процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования в клетке.
5. В субклонах Н9 и E12 с делецией *EIF3E*, демонстрирующих повышенную экспрессию *HIF2A*, наблюдается повышенная эффективность направленной мезодермальной дифференцировки.
6. Эндотелиальные производные генетически модифицированных субклонов ЭСК с делецией *EIF3E* обладают характерными ангиогенными свойствами: повышенными показателями формировать трехмерные капилляроподобные структуры на матриксе *in vitro*, демонстрируют повышенную экспрессию проангиогенных факторов: *ANG1*, *bFGF*, *VEGFR2*, *CXCR4* для субклонов Н9 и E12, *VEGF* – для субклона Н9. При этом эндотелиальные производные обладают повышенным ангиогенным потенциалом *in vitro* по сравнению с дифференцированными эндотелиальными производными исходных линий.

Публикации. Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Орищенко К.Е., Закиян С.М. Получение и характеристика эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией HIF-2 α // Гены & Клетки. – 2020. – Т. 14. – №1. – С. 29-35.
2. Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya S.B., Shevchenko A.I., Smirnova A.M., Strunov A., Karpenko A.A., Pokushalov E.A., Ivanova L.N., Makarevich P.I., Parfyonova Y.V., Aboian E., Zakian SM. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts // Journal of Translational Medicine. – 2017. – V. 15. – № 1. – e 54.
3. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Гетерогенность клеток эндотелия // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 104-112.