

УДК 577.218

Искусственные хромосомы человека и способы их доставки в клетки-мишени

С. В. Пономарцев¹, С. А. Синенко^{1*}, А. Н. Томилин^{1,2*}¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: s.sinenko@incras.ru, a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021

Принята к печати 12.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11670

РЕФЕРАТ Искусственные хромосомы человека разработаны в качестве генетических векторов, позволяющих нести большие трансгенные конструкции или целые генные локусы. Такие векторы представляют собой либо редуцированные нативные хромосомы, либо новосинтезированные генетические конструкции. Общими важными особенностями искусственных хромосом человека являются их сверхвысокая емкость и способность поддерживаться в виде самостоятельных генетических элементов без интеграции в хромосомы клеток-хозяев. В обзоре рассмотрены способы получения, структурно-функциональные особенности и области применения основных известных на сегодняшний день типов искусственных хромосом человека. Отдельно описан один из технически наиболее сложных и трудоемких элементов технологии – перенос этих векторов из клеток-доноров в клетки-реципиенты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА искусственные хромосомы человека, перенос хромосом, опосредованный микроклетками, тетрациклиновый оператор, рекомбинация, ассоциированная с трансформацией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИХЧ – искусственная хромосома человека; ИХБ – искусственная хромосома бактерий; ИХД – искусственная хромосома дрожжей; ММСТ – перенос хромосом, опосредованный микроклетками (Microcell-Mediated Chromosome Transfer); TAR – рекомбинация, ассоциированная с трансформацией; CENP-B – центромерный белок B; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; СНО – клетки яичника китайского хомячка; *tetO* – тетрациклиновый оператор; HSV-1 – вирус простого герпеса типа 1; HVJ-E – японский гемагглютинирующий вирус E; MLV – ретровирус лейкоза мышей; TACF – теломер-ассоциированная фрагментация хромосом; FSCT – перенос хромосом с помощью проточной сортировки; MWCF – слияние целых микроядерных клеток; iMCT – трансфекция изолированных метафазных хромосом; ПЭГ – полиэтиленгликоль; HPRT – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза; FACS – проточная цитометрия (fluorescence-activated cell sorting); GFP – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Искусственные хромосомы человека (ИХЧ, англ. human artificial chromosomes, HAC) были получены, в первую очередь, в качестве экспрессионных векторных систем для переноса трансгенов в эукариотические клетки. На сегодняшний день разработано множество векторных систем, различающихся по основным характеристикам: (1) способности встраиваться в хромосомы хозяйских клеток или оставаться в эписомной форме, (2) генетической емкости, определяющей максимальный размер трансгена, и (3) способу доставки. Интегрирующие векторы встраиваются в ДНК клеток-хозяев, в результате чего они наследуются дочерними клетками. К недостаткам таких векторных систем относятся случайный характер их встраивания в геном, ассо-

цированный с риском инсерционного мутагенеза, а также эпигенетическим подавлением экспрессии трансгенов. Интегрирующими векторами являются линейаризованные плазмиды, а также векторные системы на основе ретровирусов [1–3] и транспозонов, таких, как piggy-Bac, Sleeping Beauty, Tol2 [4–6].

Неинтегрирующие векторы находятся в хозяйских клетках в эписомном состоянии. В процессе клеточного деления происходит неравномерное распределение таких векторов между дочерними клетками и их постепенная утрата. Подобные системы удобны для временной трансфекции клеток, однако они не подходят для длительной экспрессии трансгенов. Примерами таких векторных систем являются кольцевые плазмиды и векторы на основе аденовирусов, альфа-вирусов, герпесвирусов, баку-

ловирусов, поксвирусов и бактериофагов [1, 2, 7]. Важным параметром векторных систем является их емкость, определяемая максимальным размером встраиваемого трансгена. С помощью плазмид можно переносить трансгены длиной до 20 т.п.н. Использование векторов на основе транспозонов позволяет осуществлять доставку трансгенной ДНК размером до 9 т.п.н., в то время как векторные системы на основе вирусной ДНК могут вмещать трансгены до 150 т.п.н. [1, 2]. Существуют различные способы доставки экспрессионных векторных систем в клетки-мишени. Плазмиды и векторы на основе ДНК-транспозонов переносят с помощью кальций-фосфатной трансфекции, электропорации, липофекции, сонопорации, микроинъекции, магнитофекции, а также с помощью так называемой «генной пушки». Доставка векторов на основе вирусной ДНК, называемая трансдукцией, осуществляется посредством характерного для данного вируса механизма заражения клетки хозяина.

Искусственные хромосомы человека – это векторные конструкции, обладающие основными характеристиками хромосом: (1) способностью автономного существования в клетке как дополнительной хромосомы и (2) способностью реплицироваться и передаваться обеим дочерним клеткам в процессе клеточного деления. Таким образом, использование ИХЧ позволяет избежать рисков инсерционного мутагенеза и при этом обеспечивает устойчивую экспрессию трансгенов. Уникальной особенностью ИХЧ является их сверхвысокая емкость, позволяющая осуществлять перенос трансгенов длиной до нескольких миллионов пар нуклеотидов, в том числе целых генных локусов с *cis*-регуляторными участками, позволяя точно воспроизводить экспрессию эндогенных локусов. Хотя на сегодняшний день получено множество ИХЧ различной структуры, эти векторные системы продолжают интенсивно совершенствоваться и модифицироваться [8–13]. ИХЧ получают с помощью двух подходов. Первый – это так называемый подход «сверху-вниз» (англ. top-down), который позволяет получать ИХЧ из нативных хромосом путем их максимальной редукции, не затрагивающей только компоненты, необходимые для стабильной репликации в клетке, а именно, центромерный и теломерные участки [14–16]. Второй подход – синтетический, «снизу-вверх» (англ. bottom-up) – позволяет получать линейные или кольцевые ИХЧ посредством синтеза и сборки больших участков прицентромерной альфа-сателлитной ДНК *in vitro* [13, 17–19]. Необходимо отметить, что, несмотря на очевидные преимущества ИХЧ перед другими векторными системами, существует ряд технических ограничений для их

активного использования как в научных исследованиях, так и в биомедицинских приложениях. Одно из главных ограничений – неэффективность и трудоемкость методов переноса ИХЧ в клетки-мишени. В нашем обзоре описаны разные типы ИХЧ, способы их доставки в клетки, а также перспективы внедрения этих эписомных векторов сверхвысокой емкости в практическую медицину.

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ИХЧ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ИХЧ, получаемые путем редукции нативных хромосом человека

Укорочение хромосом эукариотических клеток стало возможным благодаря методу теломер-ассоциированной фрагментации хромосом (ТАСФ, англ. Telomere-Associated Chromosome Fragmentation) [20]. На сегодняшний день такие ИХЧ являются наиболее охарактеризованными и усовершенствованными в контексте их использования в качестве стабильных экспрессионных векторных систем. Подход top-down позволяет удалять плечи хромосом, заменяя их новыми теломерсодержащими участками, которые встраивают в выбранные локусы с помощью гомологичной рекомбинации. В полученных таким образом ИХЧ могут оставаться единичные криптические гены и некодирующие последовательности, однако всегда присутствуют элементы, необходимые для их стабильного поддержания в клеточном ядре (теломеры) и равномерного распределения между дочерними клетками в процессе деления (центромеры). Чтобы осуществлять сайт-специфическое встраивание трансгенов в такие конструкции, в них предварительно вводят соответствующие последовательности, например, *loxP*-сайты, которые опосредуют интеграцию трансгенов посредством Cre-зависимой рекомбинации. Также, в ИХЧ часто помещают селективные маркеры, которые позволяют проводить позитивный отбор клеток, содержащих ИХЧ. С помощью метода ТАСФ получены искусственные хромосомы на основе хромосом 14 [21] и 21 человека [16, 22, 23], а также хромосомы 11 мыши [24] – в последнем случае такие хромосомы называют искусственными хромосомами мыши. Наиболее технически продвинутой на сегодняшний день является ИХЧ на основе хромосомы 21 человека, или 21-ИХЧ [16], которую получали в несколько этапов (рис. 1). Нативную хромосому 21 человека сначала переносили в клеточную линию DT-40 курицы, удобную для осуществления гомологичной рекомбинации ДНК [25]. Далее с помощью метода ТАСФ из перенесенной хромосомы удаляли р-плечо, для чего с помощью гомологичной рекомбинации в участок, находящийся вблизи центромеры,

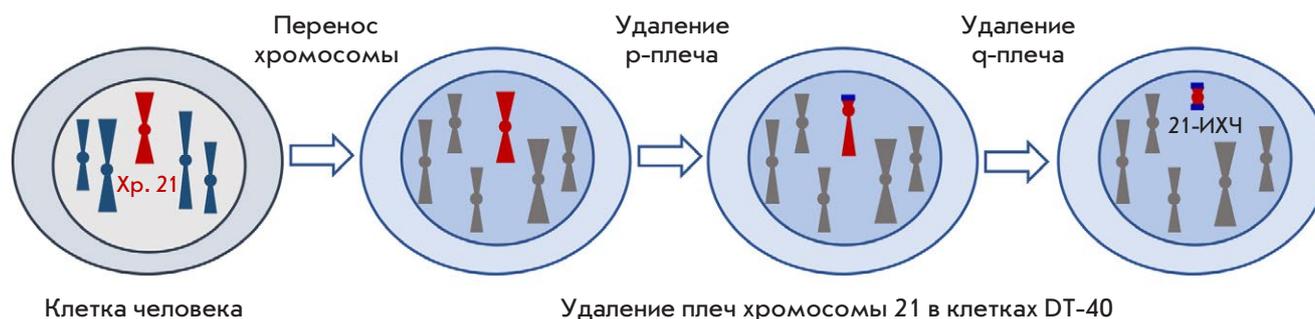


Рис. 1. Схема сборки 21-ИХЧ с помощью метода теломер-ассоциированной фрагментации хромосом. Хромосому 21 из клеток человека переносили в клетки линии DT-40. Затем с помощью гомологичной рекомбинации вблизи центromеры в нее встраивали теломерные последовательности (отмечены синим), что приводило к фрагментации хромосомы в районе вставки. Таким образом, в результате последовательного удаления плеч хромосомы с их заменой на теломерные участки получали 21-ИХЧ (21НАС)

встраивали теломерную последовательность. Вместе с теломерной последовательностью встраивали также селективный маркер, который позволяет отобрать клетки, в которых произошла рекомбинация. Аналогичным образом удаляли и q-плечо (рис. 1). Помимо теломерного участка, в 21-ИХЧ был внесен также сайт *loxP*, фрагмент гена гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*HPRT*), а также другие элементы. С помощью секвенирования показано, что, помимо центромерного участка и встроенных элементов, полученная 21-ИХЧ содержит незначительное количество остаточного генетически инертного материала [26]. Полученную ИХЧ переносили из клеток линии DT-40 в клетки линии СНО яичника китайского хомячка, в которых затем проводили финальный этап сборки ИХЧ, заключающийся в «загрузке» требуемого трансгена с помощью сайт-специфической рекомбинации, а также поддержание и наработку этой ИХЧ. Затем ИХЧ переносили в клетки-мишени с помощью описанного ниже метода ММСТ (англ. Microcell-Mediated Chromosome Transfer).

Создано несколько модификаций 21-ИХЧ, различия между которыми заключались в использовании различных селективных маркеров: гена зеленого флуоресцентного белка (*GFP*), гена тимидинкиназы (*tk*) вируса простого герпеса, а также генов устойчивости к неомицину, гигромицину и бластицидину [26]. Получена также 21-ИХЧ, содержащая мультиинтеграционный локус, включающий сайты *loxP*, *FRT*, *ΦC31attP*, *R4attP*, *TP901-1attP* и *Bxb1attP* [23]. Такую ИХЧ использовали в различных исследовательских и генотерапевтических моделях [8]. На основе этой ИХЧ созданы экспрессионные векторы для коррекции миодистрофии Дюшенна [22, 27, 28] и гемофилии А [29], с ее помощью проведено также репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши [30].

ИХЧ на основе сателлитов

Еще один тип ИХЧ, получаемый по принципу top-down, образуется путем встраивания трансгена в кластер генов рибосомной ДНК на коротких плечах акроцентрических хромосом [31, 32] (рис. 2). При таком встраивании возможны ошибки репликации, в результате чего образуются длинные инвертированные повторы [33]. Наряду с этим происходит удвоение центromеры, хромосома «ломается», и фрагмент короткого плеча формирует отдельную хромосому, которая в дальнейшем ведет себя как самостоятельная репликативная единица [34, 35] и обеспечивает устойчивую экспрессию внедренного в нее трансгена [36]. Полученные таким способом ИХЧ, названные SATAC (от англ. Satellite-DNA-based Artificial Chromosome), выделяют из клеток-доноров с помощью проточной цитофлуориметрии, переносят в клетки-мишени с помощью дендримеров и катионных частиц [37], а также посредством микроинъекций [38, 39]. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, в которые переносили SATAC, показывали способность участвовать в нормальном эмбриональном развитии [38, 40].

Альфоидные ИХЧ

Принципиально иной способ создания ИХЧ основан на синтезе протяженных нуклеотидных последовательностей, обладающих основными функциями хромосом. Основную сложность в случае подхода bottom-up представляет конструирование функциональной искусственной центромерной последовательности. Как известно, в хромосомах человека такая последовательность представляет собой тандемные повторы альфа-сателлитной ДНК общей длиной от 230 т.п.н. до нескольких миллионов пар нуклеотидов [41]. Клонирование таких последовательностей крайне затруднительно из-за спонтанной рекомбинации [42]. Первая успешная попытка

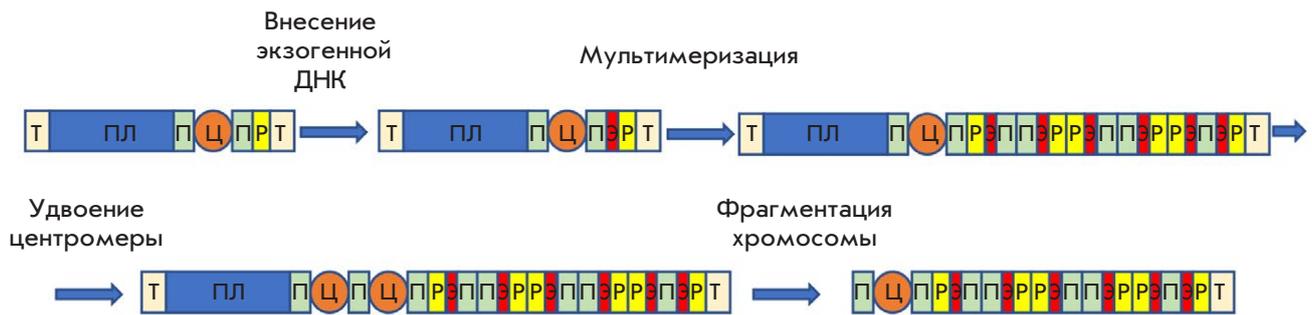


Рис. 2. Схема получения ИХЧ типа SATAC. В перичентромерную область акроцентрической хромосомы с помощью гомологичной рекомбинации вносят экзогенную ДНК, содержащую сайты для сайт-специфической рекомбинации, селективный маркер и другие последовательности. Вследствие такого встраивания происходит амплификация участков перичентромерной, рибосомной и экзогенной ДНК. После удвоения центромеры происходит фрагментация хромосомы, в результате чего формируется ИХЧ. Условные обозначения: Т – теломера, ПЛ – длинное плечо акроцентрической хромосомы, П – перичентромерный участок, Ц – центромера, Р – рибосомная ДНК, Э – экзогенная ДНК

клонирования центромерной ДНК человека была осуществлена в 1997 году [43]. С помощью последовательных раундов лигирования в бактериальную искусственную хромосому (ИХБ, англ. bacterial artificial chromosome) были клонированы тандемные повторы альфа-сателлитной ДНК из центромер хромосом 17 и Y человека длиной в несколько т.п.н., в результате чего получили повторы длиной до 173 т.п.н. Лигирование этих фрагментов позволило получить последовательности альфа-сателлитной ДНК человека длиной более 1 млн п.н. Клонированные таким образом центромерные повторы, а также теломерные последовательности и фрагменты геномной ДНК человека были перенесены в клетки линии HT1080 фибросаркомы человека, где они неспецифически рекомбинировали между собой. В некоторых случаях образовывались небольшие ИХЧ, которые оставались стабильными в клеточном ядре и наследовались обеими дочерними клетками. Таким образом впервые доказали принципиальную возможность сборки ИХЧ *de novo*, что дало импульс последующим работам в этом направлении.

Альфоидная^{tet^o}-ИХЧ

Для сборки ИХЧ такого типа используют метод амплификации альфа-сателлитной ДНК с помощью репликации по типу катящегося кольца и рекомбинации, ассоциированной с трансформацией (от англ. transformation-associated recombination, TAR) [44–46] (рис. 3). Посредством первого метода мультимеризуют ДНК-димер, один мономер которого представляет собой последовательность альфа-сателлитной ДНК длиной примерно 170 п.н. из хромосомы 17 человека, содержащей *CENP-B-бокс* (необходимый для сборки кинето-

хорного комплекса), а другой мономер – это та же последовательность, но *CENP-B-бокс* в ней заменен на сайт *tetO*. Далее мультимеризованные повторы альфа-сателлитной ДНК и линейаризованный вектор для TAR-клонирования переносили в клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, где ДНК-повторы рекомбинировали между собой. В результате этого события образовывались еще более длинные последовательности, которые встраивались в TAR-вектор, содержащий ген устойчивости к бластицидину [47–50]. Полученные конструкции переносили в клетки фибросаркомы человека линии HT1080, где они дополнительно мультимеризовались и образовывали кольцевые молекулы ДНК размером 1–2.5 млн п.н. Таким образом, основной последовательностью этих молекул была центромерная альфа-сателлитная ДНК. Показано, что полученные генетические конструкции стабильны и ведут себя в клетках как самостоятельные генетические элементы, т.е. представляют собой ИХЧ [51, 52]. Чтобы производить дальнейшие генетические манипуляции, клетки линии HT1080, содержащие полученную ИХЧ, сливали с клетками линии DT-40, которая часто используется для проведения гомологичной рекомбинации генетических элементов. В результате образовывалась ИХЧ со встроенным сайтом *loxP* и 5'-фрагментом гена *HPRT*. С помощью процедуры ММСТ (см. ниже) ИХЧ переносили в мутантные по гену *HPRT* клетки яичника китайского хомячка линии CHO. В эти клетки с помощью Cre-опосредованной рекомбинации по сайту *loxP* можно встраивать желаемый трансген. С этой целью такой трансген с его регуляторными последовательностями и фланкирующими инсульторами встраивают в ИХЧ вместе с 3'-фрагментом гена *HPRT* (рис. 3).

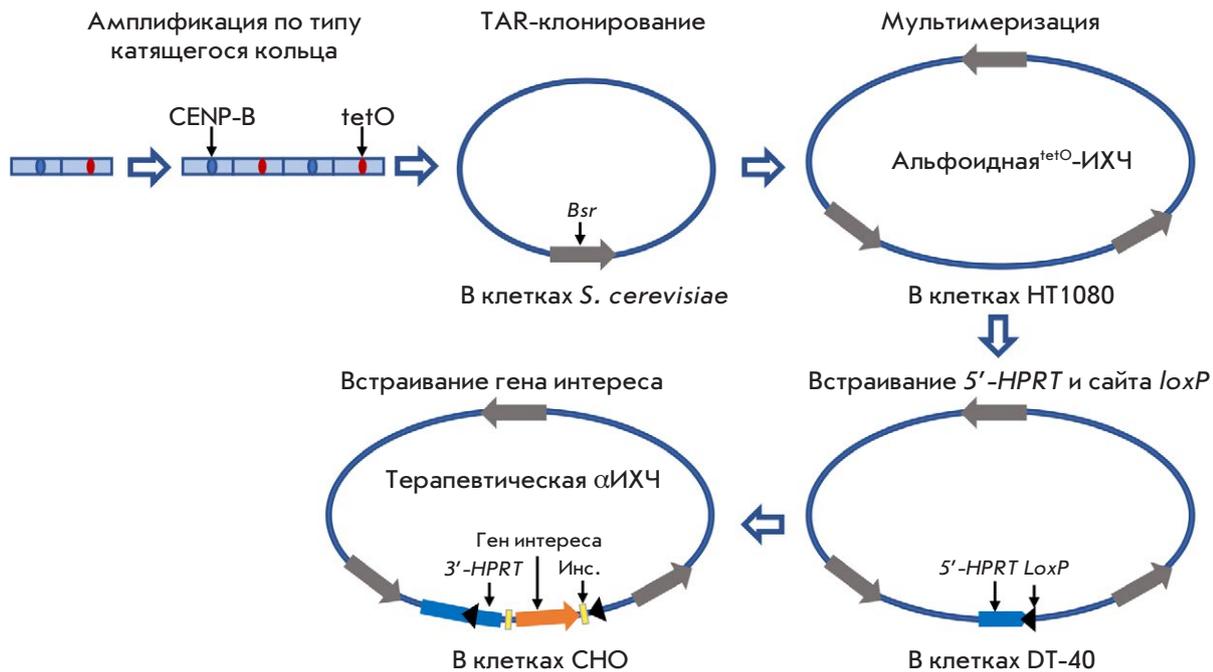


Рис. 3. Схема сборки альфоидной^{tetO}-ИХЧ. На первом этапе синтезируют димер, состоящий из двух единиц, одна из которых представляет собой альфа-сателлитный повтор из центромерного участка 17-й хромосомы человека, длиной 170 п.н., содержащий *CENP-B*-бокс (синий овал), а вторая – такой же повтор, у которого *CENP-B*-бокс заменен на тетрациклиновый оператор (*tetO* – красный овал). После амплификации такого димера по методу катящегося кольца образуется фрагмент длиной до 10 т.п.н. Затем в дрожжевых клетках осуществляется TAR-клонирование полученных фрагментов, в результате чего образуется кольцевая конструкция размером около 50 т.п.н., содержащая ген устойчивости к бластицидину (*Bsr*, серая стрелка). Мультимеризация кольцевой конструкции происходит в клетках линии HT1080, в результате чего образуется альфоидная^{tetO}-ИХЧ размером 1.1 млн п.н. Встраивание сайта *loxP* в ИХЧ происходит после слияния клеток HT1080 с клетками DT-40 (черная стрелка). Альфоидную^{tetO}-ИХЧ переносят в клетки линии CHO, в которых производят «загрузку» гена интереса (оранжевая стрелка) вместе с фланкирующими инсультными последовательностями (желтые прямоугольники) и 3'-фрагментом гена *HPRT* (синяя линия). Перенос альфоидной^{tetO}-ИХЧ в клетки-мишени осуществляют с помощью метода ММСТ

Таким образом, при корректной вставке трансгена в ИХЧ ген *HPRT* восстанавливается, что позволяет отбирать целевые клоны в присутствии НАТ (hypoxanthine-aminopterin-thymidine). Следует отметить, что наличие в альфоидных^{tetO}-ИХЧ сайтов *tetO* позволяет, при необходимости, удалять такие хромосомы в процессе клеточного деления. Для этого в клетках экспрессируют TetR-репрессоры, которые связывают *TetO*, репрессируют центромерный хроматин и тем самым ингибируют формирование кинетохорных комплексов [18, 52–54].

С помощью альфоидных^{tetO}-ИХЧ в клетки-мишени перенесли полноразмерные гены, содержащие свои *cis*-регуляторные последовательности, а затем показали стабильную экспрессию этих генов [19, 54–56]. В проведенных нами исследованиях GFP-экспрессирующие альфоидные^{tetO}-ИХЧ были перенесены в ЭСК мыши. Полученные с использованием этих клеток тератомы и химерные мыши

стабильно поддерживали эту ИХЧ и экспрессировали GFP в дифференцированных потомках ЭСК [57]. Альфоидная^{tetO}-ИХЧ была успешно перенесена нами также в ИПСК человека, которые сохраняли в присутствии этой ИХЧ плюрипотентные свойства [58]. Таким образом, мы показали, что внедрение альфоидных^{tetO}-ИХЧ не влияет на плюрипотентные свойства клеток мыши и человека. Наконец, нами была создана экспрессирующая фактор свертываемости крови VIII альфоидная^{tetO}-ИХЧ, которая может в дальнейшем использоваться для разработки комбинированных генно-терапевтических и клеточных методов лечения гемофилии А [56].

ИХЧ на основе искусственных хромосом бактерий и дрожжей

Первая работа по сборке ИХЧ на основе искусственных хромосом дрожжей (ИХД, англ. yeast artificial chromosome) была проведена в 1998 году

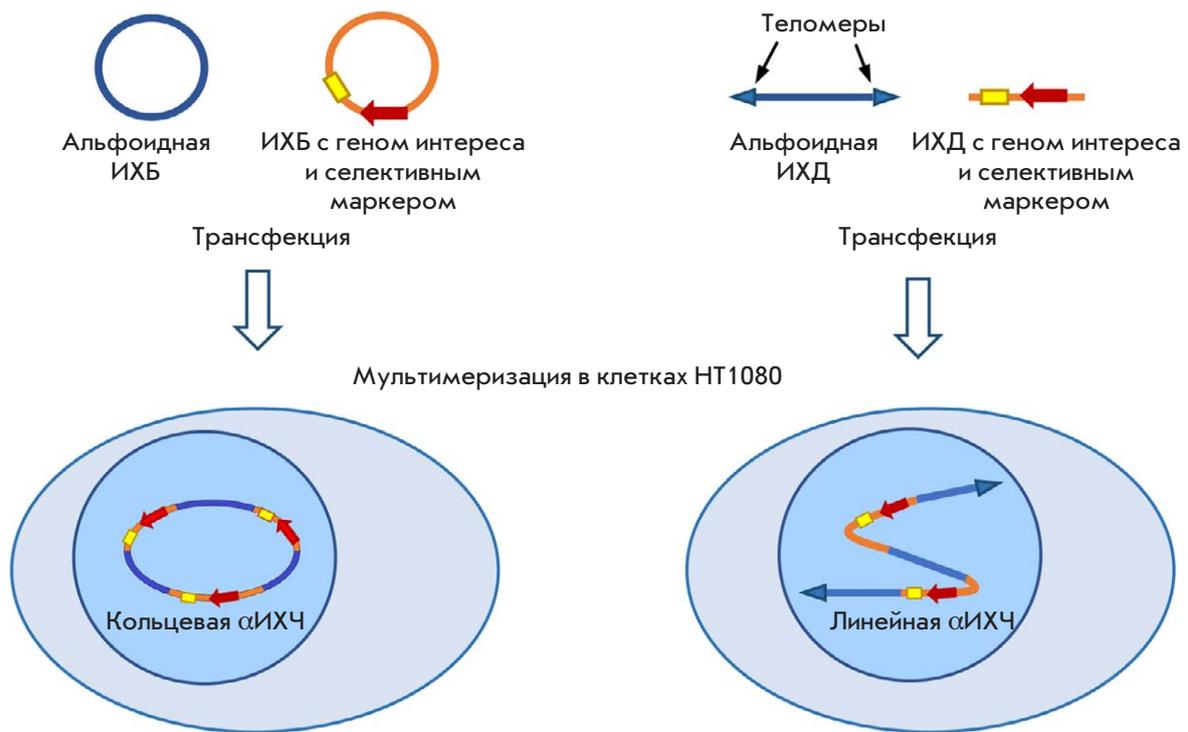


Рис. 4. Схема сборки ИХЧ на основе искусственных хромосом бактерий (ИХБ) и дрожжей (ИХД). На основе кольцевых ИХБ или линейных ИХД собирают два вектора, один из которых содержит альфоидную ДНК, а другой – целевой ген. В клетках линии HT1080 после котрансфекции этими конструкциями в результате рекомбинации и мультимеризации образуются кольцевые или линейные альфоидные ИХЧ (α ИХЧ)

[59]. В ИХД клонировали центромерную последовательность ДНК хромосомы 21 человека длиной около 100 т.п.н., содержащую мультиплицированные последовательности связывания белка CENP-B (*CENP-B-боксы*). Полученную конструкцию модифицировали в дрожжевых клетках, удалив дистальные участки и заменив их теломерными участками хромосом человека. Дополнительно встроили селективные маркеры, после чего конструкции перенесли с помощью липофекции в линию клеток фибросаркомы человека HT1080 (рис. 4). В этих клетках происходила дальнейшая мультимеризация ИХД, в результате чего образовывались ИХЧ длиной до 5 млн п.н., которые были стабильны в клетках линии HT1080 и устойчиво наследовались в ходе клеточных делений [13].

В дальнейшем оказались успешными попытки получения ИХЧ на основе ИХБ [60] (рис. 4). При таком подходе клетки HT1080 котрансфицировали ИХБ, содержащей центромерные участки хромосомы 21 человека, и последовательностями, включающими полноразмерные гены и их регуляторные элементы. В этих клетках происходила рекомбинация между внесенными молекулами ДНК с их последующей мультимеризацией. В результате

формировались кольцевые ИХЧ, которые стабильно реплицировались, наследовались дочерними клетками и поддерживали экспрессию целевых генов. Показано, что кольцевые ИХЧ, собранные с помощью ИХБ, а также линейные ИХЧ, собранные с помощью ИХД, могут успешно переноситься в ЭСК мыши. После инъекции таких клеток в бластоцисты получены химерные животные; в дифференцированных клетках-потомках ЭСК стабильно поддерживалась как сама ИХЧ, так и экспрессия внесенного с ней трансгена [60].

В 2009 году с помощью рассматриваемого подхода получена ИХЧ, несущая элементы, необходимые для ее использования в качестве экспрессионной векторной системы и включающие последовательность для сайт-специфической рекомбинации, селективный маркер, транскрипционные инсультаторы [61]. На основе данной ИХЧ разработаны также векторные конструкции с различными сайтами для сайт-специфической рекомбинации [62]. ИХЧ рассматриваемого типа использовали для решения ряда задач. С ее помощью осуществлен перенос кластера генов глобинов в клетки линии K562 [63], обеспечена иммортализация клеток [13, 64], получена трансгенная модель синдрома Дауна на мышах

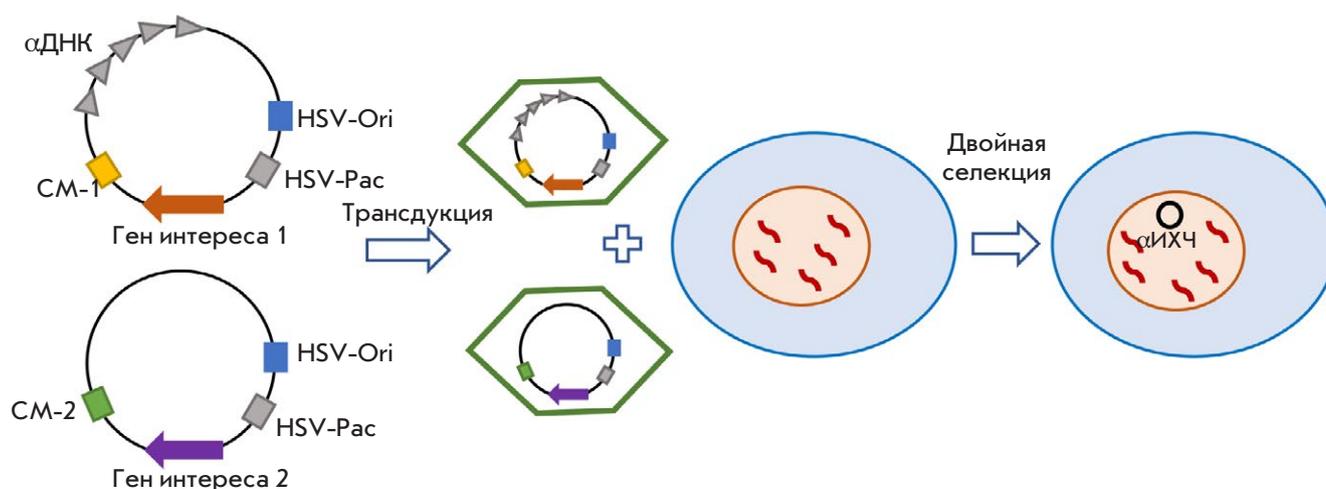


Рис. 5. Схема сборки ИХЧ с помощью ампликонов HSV-1. На основе ампликонов вируса простого герпеса (HSV-1) сконструированы два вектора, один из которых содержал вирусные сигналы – ориджин репликации (*Ori*), сигнал упаковки в вирусный капсид (*Pac*), селективные маркеры (CM-1 и 2) и целевые гены. Второй вектор содержал последовательность длиной 120 т.п.н., состоящую из альфа-сателлитных повторов 17-й хромосомы человека (α ДНК). Полученными вирусами совместно трансдуцировали клетки-мишени. В ходе двойной селекции отбирали клетки, в которых в результате рекомбинации происходит объединение двух векторных конструкций с образованием целевой альфоидной ИХЧ (α ИХЧ)

[65], найден генетический элемент, обеспечивающий сайленсинг гена *HLA-G* в большинстве тканей [66]. Наконец, подтверждена возможность переноса данной ИХЧ в ИПСК человека, что указывает на ее перспективность в генной терапии [67].

ИХЧ на основе ампликона HSV-1

Предложен уникальный способ сборки ИХЧ с помощью вектора на основе ампликона вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1, Herpes Simplex Virus-1) непосредственно в клетках млекопитающих [68]. Такой вектор несет сигнал *Pac*, необходимый для его сборки в вирусный капсид, а также сайт ориджина репликации вируса – *OriS* [69]. Чтобы получить необходимое для трансфекции количество вектора и упаковать его в вирусный капсид, вектор с трансгеном и две дополнительные генетические конструкции котрансфицировали в линию клеток зеленой мартышки. Эти дополнительные конструкции представляли собой экспрессионные векторы, один из которых содержал большинство генов HSV-1, необходимых для сборки вирусного капсида и упаковки в него вирусной ДНК. Другой вектор содержал ген *ICP27*, необходимый для регуляции экспрессии вирусных генов. Обе вспомогательные конструкции были лишены сигналов *Pac* и *OriS*, что не позволяло им реплицироваться и упаковываться в вирусный капсид. Векторы на основе вирусного ампликона способны вмещать трансген длиной до 152 т.п.н. [70, 71].

Для сборки ИХЧ, в ИХБ, содержащую сигналы *OriS* и *Pac*, вносили центромерные последовательности хромосом 17 и 21 человека, а также целевой ген и селективные маркеры [68]. Этот вектор переносили в клетки зеленой мартышки вместе с двумя вспомогательными плазмидами, в результате чего происходила наработка вектора и его упаковка в вирусный капсид, которым затем трансдуцировали клетки человека (рис. 5). Показано, что полученная генетическая конструкция ведет себя как ИХЧ, поддерживаясь в процессе клеточного деления и обеспечивая стабильную экспрессию трансгена. Также установлено, что для обеспечения митотической стабильности ИХЧ достаточно альфа-сателлитной последовательности в векторе длиной 40 т.п.н. Учитывая, что максимальная емкость векторов на основе HSV-1 составляет 152 т.п.н., а длина центромерного участка равна приблизительно 42 т.п.н., в рассматриваемую ИХЧ можно встраивать целевой трансген длиной до 110 т.п.н. Важным указанием на то, что ИХЧ, сконструированная на основе репликона HSV-1, может быть в перспективе использована в клеточной терапии, стал ее успешный перенос в ЭСК [72] и ИПСК [73] человека.

Недавно был усовершенствован метод сборки ИХЧ рассматриваемого типа. Клетки человека трансдуцировали двумя различными векторами, один из которых содержал альфа-сателлитную последовательность хромосомы 17 человека, а другой – целевые гены [73]. После попадания таких

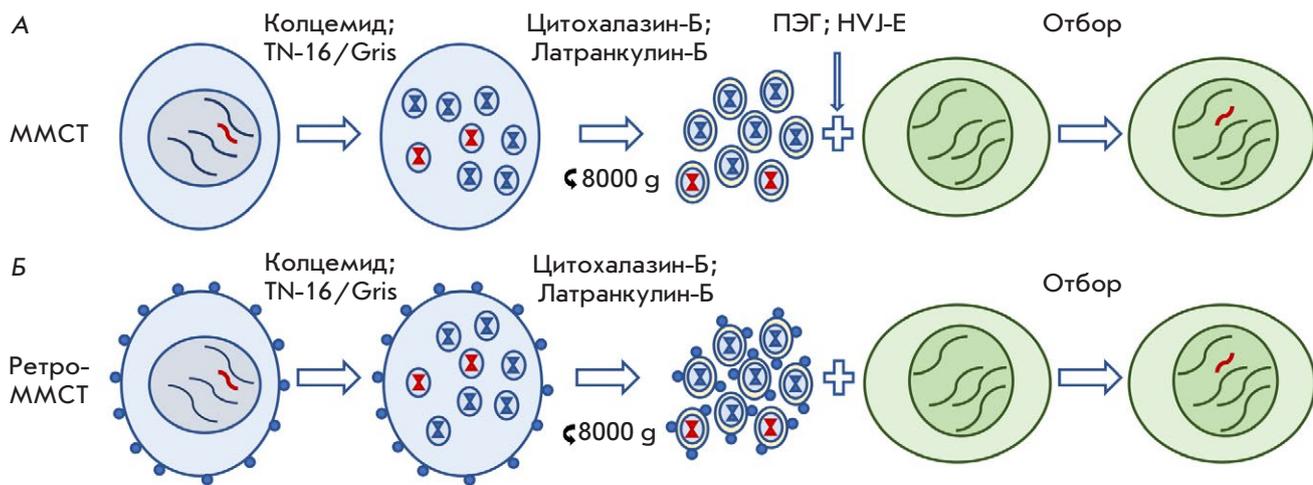


Рис. 6. Методы переноса ИХЧ из донорских клеток в реципиентные с помощью метода ММСТ. Донорские клетки изображены голубыми овалами, а реципиентные – зелеными овалами. ИХЧ обозначена красным цветом. А – оригинальный метод ММСТ. На первом этапе клетки обрабатывают колцемидом или цитостатиками TN-16 и гризеофульвином (Gris) для образования метафазных микроядер. После обработки цитохалазином-Б или латранкулином-Б собирают фракцию микроклеток с помощью центрифугирования и фильтрования. Микроклетки сливают с клетками-реципиентами с использованием ПЭГ или оболочек вируса HVJ-E. Клетки, содержащие ИХЧ, отбирают на селективной среде. Б – метод ретро-ММСТ, в котором клетки-доноры предварительно трансдуцируют лентивирусами, кодирующими белок MLV (показан синими кружками на поверхности донорских клеток)

векторных конструкций в ядро клетки между ними происходила рекомбинация, образовывалась стабильная ИХЧ, размер которой был в 2 раза больше первоначальной (рис. 5). Таким образом, с помощью указанного подхода можно осуществлять перенос трансгенов длиной до 260 т.п.н. [11].

Способы переноса ИХЧ в целевые клетки

Основным способом переноса ИХЧ и других векторов, размер которых превышает 1 млн п.н., является метод ММСТ (microcell-mediated chromosome transfer), позволяющий переносить данные векторы от клеток-доноров в целевые клетки с помощью так называемых микроклеток (рис. 6А) [74]. В клетках-донорах инициируют образование «микроядер», представляющих собой отдельные хромосомы, окруженные ядерной оболочкой. Для этого клетки-доноры инкубируют с цитостатическими агентами – колцемидом [75] или гризеофульвином совместно с TN-16 [76, 77], вызывающими остановку клеточного цикла на стадии метафазы. В качестве клеток-доноров используют А9 (клетки подкожной клетчатки мыши) или СНО [8]. Клетки-доноры затем фрагментируют на микроклетки путем обработки блокаторами сборки актиновых филаментов (цитохалазин-Б [75] или латранкулин-Б [76, 77]) с последующим длительным центрифугированием. Фракцию «микроклеток» выделяют

с помощью фильтрации [75] или фракционирования в градиенте перкола [60]. «Микроклетки» затем сливают с клетками-мишенями с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) [75] или с помощью липидных оболочек японского гемагглютинирующего вируса (HVJ-E) [23, 56, 57]. Улучшенную по сравнению с оригинальным методом эффективность показал метод «ретро-ММСТ» (рис. 6Б), основанный на использовании белка оболочки вируса лейкоза мышей (MLV, murine leukemia virus). Белок MLV опосредует связывание несущих его микроклеток с белком плазмалеммы, который присутствует на поверхности практически всех типов клеток млекопитающих, увеличивая таким образом эффективность слияния клеток с микроклетками [78]. Используя этот вариант ММСТ, альфоидную^{tetO}-ИХЧ успешно перенесли в ИПСК человека [58]. Важно отметить, что можно совмещать различные модификации ММСТ на разных его стадиях, тем самым добиваясь повышения эффективности переноса ИХЧ [12, 56, 58, 77]. Клетки, содержащие целевую ИХЧ, выявляют с помощью культивирования в присутствии антибиотиков, резистентность к которым привносится вместе с ИХЧ (бластицидином, G418 и др.).

Помимо метода ММСТ, существуют и методы переноса ИХЧ без использования микроклеток. Так, в методе MWCF (Micronucleated Whole Cell

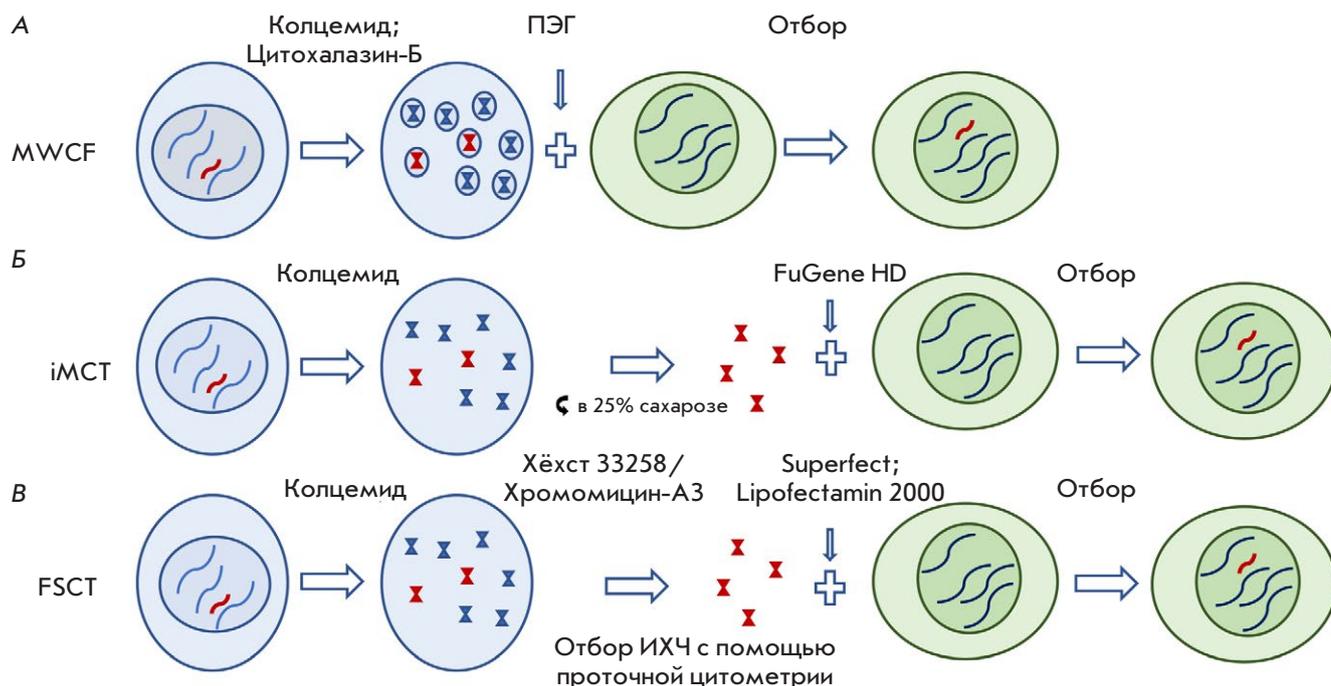


Рис. 7. Методы переноса ИХЧ без использования микроклеток. А – метод MWCF – слияние донорских клеток с клетками-реципиентами. Б – метод iMCT – трансфекция изолированных хромосом в целевые клетки с помощью липофекции. После обработки колцемидом донорские клетки лизируют и выделенные на градиенте сахарозы ИХЧ переносят в клетки-реципиенты с помощью реактива FuGene HD. В – в методе FSCT окрашенные Хёхст 33258 и хромомицином-А3 ИХЧ обогащают с помощью проточной цитофлуориметрии и трансфицируют в клетки-мишени с помощью липофекции

Fusion) клетки-доноры сливают с клетками-мишенями с использованием ПЭГ после последовательного воздействия колцемидом и цитохалазином-Б [79]. Метод разработан для переноса ИХЧ из клеток, неустойчивых к длительному воздействию цитостатиков. Преимуществом метода является высокая (в сравнении с ММСТ) эффективность и простота в исполнении. Однако существенный недостаток данного метода состоит в использовании для слияния клеток разных видов лабораторных животных. Метод iMCT (isolated Metaphase Chromosome Transfer) позволяет осуществлять перенос ИХЧ из клеток-доноров, неспособных к образованию микроядер. В этом методе ИХЧ выделяют из лизата клеток, предварительно обработанных колцемидом, используя разделение в градиенте концентрации сахарозы [80]. С помощью липофекции полученные ИХЧ трансфицируют в клетки-мишени. Этот метод не нашел широкого применения в связи с низкой эффективностью. Наконец, метод FSCT (Flow Sorted Chromosome Transfer), разработанный для ИХЧ, содержащих С-Г-богатые последовательности. В этом случае ИХЧ выделяют с помощью проточной цитофлуо-

риметрии после их обработки красителями Хёхст 33258 и хромомицином-А3 (рис. 7В). Выделенные ИХЧ затем трансфицируют в целевые клетки с помощью липофекции [37, 81].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день ИХЧ рассматриваются как многообещающие экспрессионные векторные системы. Уникальным свойством ИХЧ является их инертность и автономность в геноме клеток-мишеней, а также способность переносить трансгены большого размера. Эти свойства генетических векторов на основе ИХЧ востребованы во многих областях современной биологии и медицины. С помощью ИХЧ разработаны подходы к репрограммированию клеток в ИПСК, созданы трансгенные животные, разработаны экспериментальные модели лечения генетических заболеваний. ИХЧ активно используются также в изучении функций хромосом и хромосомной нестабильности.

Однако, несмотря на большую востребованность ИХЧ, очевидно, что требуется значительное совершенствование технологии их получения и методов переноса для внедрения и широкого применения

в лабораторной практике и биомедицине. В первую очередь, довольно трудоемким и низкоэффективным является процесс переноса ИХЧ в реципиентные клетки. Успешная оптимизация методов переноса ИХЧ в реципиентные клетки повысит востребованность данных генетических векторов в исследовательских и терапевтических приложениях. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета в рамках научного проекта № 93024558, гранта Российского научного фонда № 20-14-00242 и Соглашения № 075-15-2021-1075 с Минобрнауки от 28.09.2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F.L. // *Brit. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. № 2. P. 153–165.
- Ghosh S., Brown A.M., Jenkins C., Campbell K. // *Appl. Biosafety.* 2020. V. 25. № 1. P. 7–18.
- Lundstrom K. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 3. P. 1–15.
- Hackett P.B., Largaespada D.A., Cooper L.J. // *Mol. Therapy.* 2010. V. 18. № 4. P. 674–683.
- Ivics Z., Izsvák Z. // *Mob. DNA.* 2010. V. 1. № 25. P. 1–15.
- Skipper K.A., Andersen P.R., Sharma N., Mikkelsen J.G. // *J. Biomed. Sci.* 2013. V. 20. № 1. P. 92.
- Blanc F., Mondain M., Bemelmans A.-P., Affortit C., Puel J.-L., Wang J. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 2. P. 589.
- Oshimura M., Kazuki Y., Iida Y., Uno N. // *eLS.* 2013. P. 1–12.
- Kouprina N., Larionov V. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 1–5.
- Katona R.L. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 143–157.
- Moralli D., Monaco Z.L. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 390. № 1. P. 111931.
- Sinenko S.A., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 389. № 1. P. 111882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32017931>
- Ikeno M., Hasegawa Y. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 390. № 1. P. 111793. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31874174>
- Kazuki Y., Oshimura M. // *Mol. Therapy.* 2011. V. 19. № 9. P. 1591–1601. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750534>
- Koi M., Shimizu M., Morita H., Yamada H., Oshimura M. // *Jpn. J. Cancer Res.* 1989. V. 80. № 5. P. 413–418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2502516>
- Katoh M., Ayabe F., Norikane S., Okada T., Masumoto H., Horike S., Shirayoshi Y., Oshimura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. № 2. P. 280–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358173>
- Suzuki N., Nishii K., Okazaki T., Ikeno M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 36. P. 26615–26623. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837455>
- Iida Y., Kim J.H., Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Hayashi M., Erliandri I., Lee H.S., Samoshkin A., Masumoto H., et al. // *DNA Res.* 2010. V. 17. № 5. P. 293–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798231>
- Sinenko S.A., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. № 4. P. 1207–1220.
- Farr C.J., Stevanovic M., Thomson E.J., Goodfellow P.N., Cooke H.J. // *Nat. Genet.* 1992. V. 2. № 4. P. 275–282.
- Kuroiwa Y., Tomizuka K., Shinohara T., Kazuki Y., Yoshida H., Ohguma A., Yamamoto T., Tanaka S., Oshimura M., Ishida I. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10 SUPPL. P. 1086–1090.
- Kazuki Y., Hiratsuka M., Takiguchi M., Osaki M., Kajitani N., Hoshiya H., Hiramatsu K., Yoshino T., Kazuki K., Ishihara C., et al. // *Mol. Therapy.* 2010. V. 18. № 2. P. 386–393.
- Yamaguchi S., Kazuki Y., Nakayama Y., Nanba E., Oshimura M., Ohbayashi T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. P. 1–11.
- Takiguchi M., Kazuki Y., Hiramatsu K., Abe S., Iida Y., Takehara S., Nishida T., Ohbayashi T., Wakayama T., Oshimura M. // *ACS Synthetic Biol.* 2012. V. 3. № 12. P. 903–914.
- Buerstedde J.M., Takeda S. // *Cell.* 1991. V. 67. № 1. P. 179–188.
- Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Abe S., Iida Y., Osaki M., Katoh M., Hiratsuka M., Shirayoshi Y., Hiramatsu K., et al. // *Gene Therapy.* 2011. V. 18. № 4. P. 384–393.
- Tedesco F.S., Gerli M.F.M., Perani L., Benedetti S., Ungaro F., Cassano M., Antonini S., Tagliafico E., Artusi V., Longa E., et al. // *Sci. Translat. Med.* 2012. V. 4. № 140. P. 1–13.
- Benedetti S., Uno N., Hoshiya H., Ragazzi M., Ferrari G., Kazuki Y., Moyle L.A., Tonlorenzi R., Lombardo A., Chaouch S., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2018. V. 10. № 2. P. 254–275.
- Yakura Y., Ishihara C., Kurosaki H., Kazuki Y., Komatsu N., Okada Y., Doi T., Takeya H., Oshimura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 431. № 2. P. 336–341.
- Hiratsuka M., Uno N., Ueda K., Kurosaki H., Imaoka N., Kazuki K., Ueno E., Akakura Y., Katoh M., Osaki M., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. P. 1–14.
- Lindenbaum M., Perkins E., Csonka E., Fleming E., Garcia L., Greene A., Gung L., Hadlaczy G., Lee E., Leung J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 21. P. 1–15.
- Csonka E. // *Mammal. Chromosome Engin.: Meth. Protocols, Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 738. P. 141–149.
- Holló G., Kereső J., Praznovszky T., Cserpán I., Fodor K., Katona R., Csonka E., Fátyol K., Szeles A., Szalay A.A., et al. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. № 3. P. 240–247.
- Vanderbyl S., MacDonald G.N., Sidhu S., Gung L., Telenius A., Perez C., Perkins E. // *STEM CELLS.* 2004. V. 22. № 3. P. 324–333.
- Vanderbyl S.L., Sullenbarger B., White N., Perez C.F., MacDonald G.N., Stodola T., Bunnell B.A., Ledebur H.C., Lasky L.C. // *Exp. Hematol.* 2005. V. 33. № 12. P. 1470–1476.
- Kennard M.L., Goosney D.L., Monteith D., Roe S., Fischer D., Mott J. // *Biotechnol. Bioengin.* 2009. V. 104. № 3. P. 526–539.
- de Jong G., Telenius A., Vanderbyl S., Meitz A., Drayer J. // *Chromosome Res.* 2001. V. 9. № 6. P. 475–485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592482>
- Co D.O., Borowski A.H., Leung J.D., van der Kaa J., Hengst S., Platenburg G.J., Pieper F.R., Perez C.F., Jirik F.R., Drayer J.I. // *Chromosome Res.* 2000. V. 8. № 3. P. 183–191.
- Blazso P., Sinko I., Katona R.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 738. № 2. P. 161–181.
- Katona R.L., Sinkó I., Holló G., Szucs K.S., Praznovszky T., Kereső J., Csonka E., Fodor K., Cserpán I., Szakál B., et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 23. P. 3830–3838.
- Mehta G.D., Agarwal M.P., Ghosh S.K. // *Mol. Genet. Genom.* 2010. V. 284. № 2. P. 75–94.

42. Neil D.L., Villasante A., Fisher R.B., Vetric D., Cox B., Tyler-Smit C. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 6. P. 1421–1428.
43. Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K., Willard H.F. // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. № 4. P. 345–355.
44. Kouprina N., Larionov V. // *Curr. Protocols Hum. Genet.* 2006. Chapter 5:Unit 5.17. doi: 10.1002/0471142905.hg0517s49.
45. Larionov V., Kouprina N., Graves J., Resnick M.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 24. P. 13925–13930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13925>
46. Kouprina N., Larionov V. // *Chromosoma.* 2016. V. 125. № 4. P. 621–632. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27116033>
47. Ebersole T., Okamoto Y., Noskov V.N., Kouprina N., Kim J.H., Leem S.H., Barrett J.C., Masumoto H., Larionov V. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 15. P. 1–8.
48. Kouprina N., Larionov V. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 14. P. 16–26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31276008>
49. Kouprina N., Kim J., Larionov V. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 8. P. 1–27.
50. Kouprina N., Lee N.C.O., Kononenko A.V., Samoshkin A., Larionov V. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1227. P. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1652-8_1
51. Nakano M., Cardinale S., Noskov V.N. // *Chemtracts.* 2008. V. 21. № 3. P. 87–88.
52. Kouprina N., Earnshaw W.C., Masumoto H., Larionov V. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. V. 70. № 7. P. 1135–1148.
53. Kononenko A.V., Lee N.C., Liskovykh M., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V., Kouprina N. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 9. P. 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712097>
54. Lee N.C.O., Petrov N.S., Larionov V., Kouprina N. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 12. P. 1–36.
55. Kim J.H., Kononenko A., Erliandri I., Kim T.A., Nakano M., Iida Y., Barrett J.C., Oshimura M., Masumoto H., Earnshaw W.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 50. P. 20048–20053.
56. Ponomartsev S.V., Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Voropaev I.N., Savina M.M., Kuzmin A.A., Kuzmina E.Y., Kondrashkina A.M., Larionov V., et al. // *Cells.* 2020. V. 9. № 4. P. 1–17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32260189>
57. Liskovykh M., Ponomartsev S., Popova E., Bader M., Kouprina N., Larionov V., Alenina N., Tomilin A. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. № 8. P. 1268–1273. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695642>
58. Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Ponomartsev S.V., Kuzmin A.A., Khudiakov A.A., Malashicheva A.B., Alenina N., Larionov V., Kouprina N., et al. // *Cells.* 2018. V. 7. № 12. P. 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30544831>
59. Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N.I., Cooke H., Masumoto H. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 5. P. 431–439.
60. Suzuki N., Nishii K., Okazaki T., Ikeno M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 36. P. 26615–26623.
61. Ikeno M., Suzuki N., Hasegawa Y., Okazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 6. P. 1–9.
62. Suzuki E., Nakayama M. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 8. P. 1–11.
63. Suzuki N., Itou T., Hasegawa Y., Okazaki T., Ikeno M. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 38. № 5. P. 1–9.
64. Ito M., Ito R., Yoshihara D., Ikeno M., Kamiya M., Suzuki N., Horiguchi A., Nagata H., Yamamoto T., Kobayashi N., et al. // *Cell Transplant.* 2008. V. 17. № 1–2. P. 165–171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468246>
65. Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Kudoh J., Ikeno M., Shimizu N. // *Transgenic Res.* 2014. V. 23. № 2. P. 317–329.
66. Ikeno M., Suzuki N., Kamiya M., Takahashi Y., Kudoh J., Okazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 21. P. 10742–10752.
67. Hasegawa Y., Ikeno M., Suzuki N., Nakayama M., Ohara O. // *Biol. Meth. Protocols.* 2018. V. 3. № 1. P. 1–10.
68. Moralli D., Simpson K.M., Wade-Martins R., Monaco Z.L. // *EMBO Repts.* 2006. V. 7. № 9. P. 911–918.
69. Frenkel N. // *Curr. Gene Therapy.* 2006. V. 6. № 3. P. 277–299.
70. Wade-Martins R., Smith E.R., Tyminski E., Chiocca E.A., Saeki Y. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 11. P. 1067–1070.
71. Zaupa C., Revol-Guyot V., Epstein A.L. // *Hum. Gene Therapy.* 2003. V. 14. № 11. P. 1049–1063.
72. Moralli D., Monaco Z.L. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 105–110.
73. Chan D.Y., Moralli D., Wheatley L., Jankowska J.D., Monaco Z.L. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 388. № 2. P. 111840.
74. Doherty A.M., Fisher E.M. // *Mamm. Genome.* 2003. V. 14. № 9. P. 583–592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629108>
75. Fournier R.E.K., Ruddle F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 1. P. 319–323.
76. Liskovykh M., Lee N.C., Larionov V., Kouprina N. // *Mol. Therapy – Meth. Clin. Dev.* 2016. V. 3. P. 1–9.
77. Liskovykh M., Larionov V., Kouprina N. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 9. P. 1–25.
78. Suzuki T., Kazuki Y., Oshimura M., Hara T. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. P. e0157187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27271046>
79. Paulis M., Bensi M., Orioli D., Mondello C., Mazzini G., D’Incalci M., Falcioni C., Radaelli E., Erba E., Raimondi E., et al. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2543–2550.
80. Suzuki N., Itou T., Hasegawa Y., Okazaki T., Ikeno M. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 5. P. e33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007595>
81. Klobutcher L.A., Miller C.L., Ruddle F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 3610–3614.