

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2025.05.86-89>

## **Молекулярное картирование афидиколин-чувствительных ломких сайтов хромосом в ИПСК человека выявило нестабильность длинных клинически значимых генов**

Кислова А.В., Свиридов Ф.С., Пожитнова В.О., Свиридова В.В., Киселев Д.С., Гумерова Л.И., Воронина Е.С., Жегло Д.Г.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова  
115478, г.Москва, ул. Москворечье, д.1

**Введение.** Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) выступают важной моделью для изучения процессов эмбриогенеза и генетических заболеваний. В то же время для ИПСК характерны повышенный уровень стресса репликации и генетическая нестабильность в митозе. В условиях стресса репликации в хромосомном материале происходят разрывы в участках конститутивных ломких сайтов (КЛС), наблюдаемые на метафазных пластинках. Картирование КЛС в ИПСК помогает лучше понять функциональные последствия стресса репликации для полученных из ИПСК производных, а также механизмы соматического мутагенеза (в том числе в эмбриональном периоде). Текущее исследование продолжает работу по картированию КЛС в ИПСК человека в контексте изучения их генетической стабильности и безопасности.

**Цель:** молекулярное картирование КЛС хромосом в ИПСК методом FISH с зондами, маркирующими границы длинных генов.

**Методы.** ИПСК человека культивировались бесфицерным методом. Индукцию хроматидных разрывов проводили добавлением в среду афидиколина и кофеина. Зонды FISH, специфичные к границам изучаемых генов, были получены с помощью ПЦР длинных фрагментов и ник-трансляции.

**Результаты.** Гены-мишени были выбраны на основе их размера внутри границ хромосомных бэндов, в которых наблюдались хроматидные разрывы при обработке ингибиторами репликации. Флуоресцентные сигналы от зондов FISH, специфичных к границам генов *ANKS1B*, *LRP1B*, *WWOX*, *NRXN3*, *LINGO2*, *PRKN*, регистрировались по разные стороны от хроматидного разрыва, что свидетельствовало о локализации КЛС в пределах гена-мишени.

**Выводы.** Показана репликационная нестабильность в ИПСК для шести клинически значимых генов, которые функционально связаны с онкогенезом и развитием и функционированием нервной ткани. Эти результаты могут прояснить роль стресса репликации при формировании соматического мозаицизма в эмбриогенезе. Также мутации в этих генах могут сказаться на функциональной состоятельности дифференцированных производных ИПСК.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), стресс репликации, *ANKS1B*, *LRP1B*, *WWOX*, *NRXN3*, *LINGO2*, *PRKN*.

**Для цитирования:** Кислова А.В., Свиридов Ф.С., Пожитнова В.О., Свиридова В.В., Киселев Д.С., Гумерова Л.И., Воронина Е.С., Жегло Д.Г. Молекулярное картирование афидиколин-чувствительных ломких сайтов хромосом в ИПСК человека выявило нестабильность длинных клинически значимых генов. *Медицинская генетика* 2025; 24(5): 86-89.

**Автор для корреспонденции:** Кислова А.В.; e-mail: anastasiakislovav@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки. России для ФГБНУ МГНЦ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 29.05.2025

**Принята:** 10.06.2025

## **Molecular mapping of aphidicolin-sensitive fragile chromosome sites in human iPSCs reveals instability of long clinically relevant genes**

Kislova A.V., Sviridov F.S., Pozhitnova V.O., Sviridova V.V., Kiselev D.S., Gumerova L.I., Voronina E.S., Zheglo D.G.

Research Centre for Medical Genetics  
1, Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

**Background.** Induced pluripotent stem cells (iPSCs) serve as an important model for studying the processes of embryogenesis and genetic diseases. At the same time, iPSCs are characterized by elevated levels of replication stress and genetic instability during mitosis. Under conditions of replication stress, breaks occur in the chromosomal material at constitutive fragile sites (CFS), which are observed on metaphase plates. Mapping CFS in iPSCs helps to better understand the functional consequences of replication stress for the derivatives obtained from iPSCs, as well as the mechanisms underlying somatic mutagenesis (including those occurring during the embryonic period). The current study continues the work on mapping constitutive fragile sites in human induced pluripotent stem cells in the context of investigating their genetic stability and safety.

**Aim.** Molecular mapping of constitutive fragile sites in iPSCs using FISH probes marking the boundaries of long genes.

**Methods.** Human iPSCs were cultured using a feeder-free method. Induction of chromatid breaks was performed by adding aphidicolin and caffeine to the medium. FISH probes specific to the boundaries of the studied genes were obtained using long range PCR and nick translation.

**Results.** The target genes were selected based on their size within the boundaries of the chromosomal bands where chromatid breaks were observed following treatment with replication inhibitors. Fluorescent signals from FISH probes specific to the boundaries of the genes *ANKS1B*, *LRP1B*, *WWOX*, *NRXN3*, *LINGO2*, and *PRKN* were detected on either side of the chromatid break, indicating the localization of the CFS within the target gene.

**Conclusion.** Replication instability has been revealed in iPSCs for six clinically significant genes that are functionally associated with oncogenesis and the development and functioning of nervous tissue. These results may clarify the role of replication stress in the formation of somatic mosaicism during embryogenesis. Additionally, mutations in these genes may affect the functional viability of differentiated derivatives of iPSCs.

**Keywords:** induced pluripotent stem cells (iPSC), replication stress, *ANKS1B*, *LRP1B*, *WWOX*, *NRXN3*, *LINGO2*, *PRKN*.

**For citation:** Kislova A.V., Sviridov F.S., Pozhitnova V.O., Sviridova V.V., Kiselev D.S., Gumerova L.I., Voronina E.S., Zheglo D.G. Molecular mapping of aphidicolin-sensitive fragile chromosome sites in human iPSCs reveals instability of long clinically relevant genes. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2025; 24(5): 86-89. (In Russian).

**Corresponding author:** Kislova A.V.; **e-mail:** anastasiakislovav@gmail.com

**Funding.** The study was carried out under the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education for the Research Centre for Medical Genetics.

**Conflict of Interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 29.05.2025

**Accepted:** 10.06.2025

## Введение

Индуктированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) выступают важной моделью для изучения процессов эмбриогенеза и генетических заболеваний. ИПСК также являются ресурсом для получения программируемых производных. В то же время для ИПСК характерны повышенный уровень стресса репликации и генетическая нестабильность в митозе. В условиях стресса репликации в хромосомном материале происходят разрывы в участках конститутивных ломких сайтов (кЛС), наблюдаемые на метафазных пластинках [1, 2]. Паттерн кЛС тканеспецифичен и не был ранее изучен для ИПСК. В лаборатории ведется работа по идентификации генов, для которых характерна нестабильность в ИПСК. Ранее командой лаборатории уже была опубликована работа о первом картированном в ИПСК конститутивном ломком сайте, находящемся в нейрональном гене *ANKS1B*. Текущее исследование продолжает изучение кЛС в ИПСК в контексте их генетической стабильности и безопасности.

**Цель исследования:** молекулярное картирование кЛС хромосом в ИПСК методом FISH с зондами, маркирующими границы длинных генов.

## Методы

Линия клеток ИПСК RCMGi001-A была взята из Биобанка «Всероссийская коллекция биологических образцов наследственных заболеваний» (ФГБНУ МГНЦ, Москва, Россия). Культуру вели на подложке IPS-Verified Star Matrigel (ABW, Китай) в среде TeSR-E8

(StemCell Technologies). Афидиколин (A4487, Sigma Aldrich) в конечной концентрации 0,1 мкМ и 1 мМ кофеин (C0750, ReagentPlus®) добавляли со свежей средой за 24 ч до фиксации клеток.

Собственные FISH-зонды были получены путем флуоресцентного мечения ампликонов ПЦР длинных фрагментов (BioMaster LR HS-PCR 2 × master mix (Biolabmix, Россия)).

Для проведения FISH препараты метафаз ко-денатурировали с зондом при 76°C в течение 5 мин и гибридизовали при 37°C в течение 24–48 ч в системе LFHS-A10.

## Результаты и обсуждение

Для моделирования стресса репликации в лабораторных условиях клеточная культура обрабатывается 0,1 мкМ афидиколина и 1 мМ кофеина, и в точках расположения кЛС наблюдаются пробелы и разрывы на метафазных пластинках. Установить локализацию разрывов в геноме можно путём G-бэндинга, однако его разрешающая способность не позволяет определить, какие именно гены являются горячими точками хромосомной нестабильности в условиях индуцированного стресса репликации в ИПСК. На основе предварительных данных G-бэндинга был проведён анализ участков хромосомной ломкости в геномном браузере UCSC. Так как известно, что кЛС чаще всего расположены в длинных генах (1 млн п.н. и больше), на основе этого были отобраны гены-кандидаты. Синтезировали зонды FISH, специфичные

к участкам, соответствующим началу и концу каждого гена-кандидата. Таким образом, при обнаружении на метафазной пластинке разрыва сигнал наблюдался по обе стороны от него (рисунок).

В настоящий момент лабораторией картированы кЛС в ИПСК в шести генах: *ANKS1B*, *LRP1B*, *WWOX*, *NRXN3*, *LINGO2*, *PRKN*. Гены *LRP1B* [3] и *WWOX* [4, 5] описаны в литературе как опухолевые гены, также упоминается онкоспурессорная функция гена *PRKN* [6]. Остальные гены связаны с развитием и функциями нервных тканей [7, 8, 9, 10]. Отмечена связь гена *WWOX* с эпилептической энцефалопатией [11, 12].

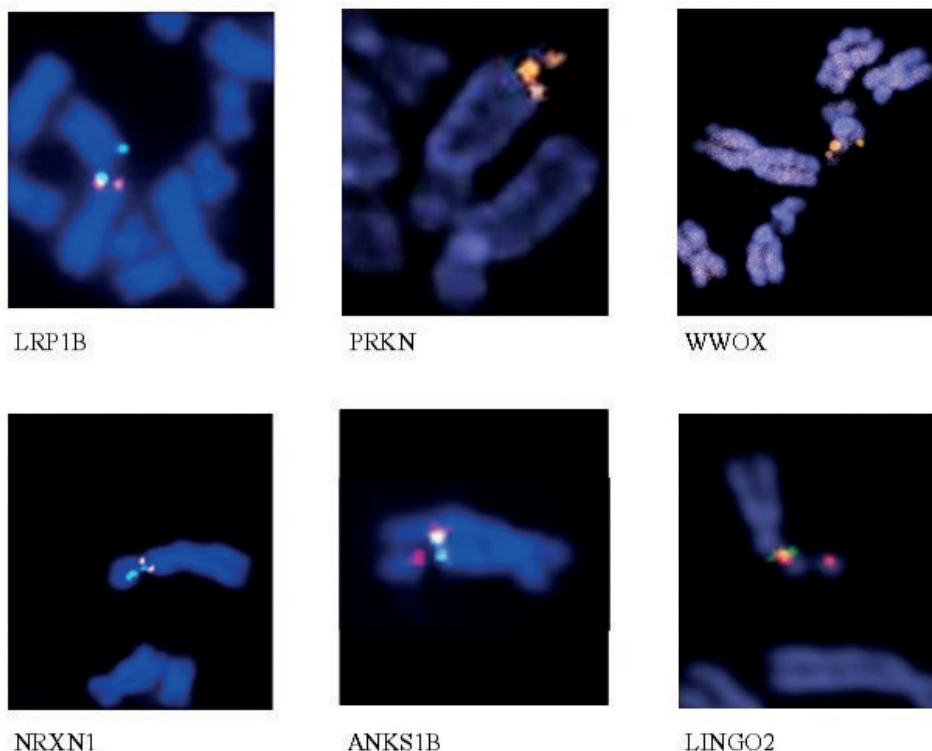
### Заключение

Дифференцированные производные ИПСК могут наследовать возникшие в них генетические аномалии. Поэтому важно уделять внимание вопросу стабильности генов, важных для получаемых из них дифференцированных производных, а также связанных с канцерогенезом.

Нейрональные прогениторные и стволовые клетки, в том числе полученные из ИПСК, нашли широкое прикладное применение в лечении нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Гентингтона) [13]. Таким образом, регенеративная медицина подняла вопрос об изучении стабильности нейрональных генов в ИПСК. В то же время в силу длины нейрональных генов часто именно они содержат в себе кЛС, что говорит об их важности как объектов исследования.

### Литература/References

1. Ahuja A.K., Jodkowska K., Teloni F., et al. A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications* 2016 7:1. 2016; 1(7): 1–11. DOI:10.1038/ncomms10660.
2. Milagre I., Pereira C., Oliveira R.A. Compromised Mitotic Fidelity in Human Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 15(24): 11933. DOI:10.3390/IJMS241511933.
3. He Z., Feng W., Wang Y., et al. *LRP1B* mutation is associated with tumor immune microenvironment and progression-free survival in



Разрывы хромосомного материала в местах локализации конститутивных ломких сайтов с зондами FISH, специфичными к краям изучаемых генов

Breaks in chromosomal material at the locations of constitutive fragile sites with FISH probes specific to the edges of the genes

- lung adenocarcinoma treated with immune checkpoint inhibitors. *Translational Lung Cancer Research*. 2023. 12(3): 510–529. DOI:10.21037/TLCR-23-39/COIF.
4. Baryła I., Styczeń-Binkowska E., Bednarek A.K. Alteration of WWOX in human cancer, a clinical view. *Experimental Biology and Medicine*. 2015; 240(3): 305. DOI:10.1177/1535370214561953.
  5. Husanie H., Abu-Remaileh M., Maroun K., et al. Loss of tumor suppressor WWOX accelerates pancreatic cancer development through promotion of TGFβ/BMP2 signaling. *Cell Death and Disease*. 2022; 13(12): 1–14. DOI:10.1038/s41419-022-05519-9.
  6. Rouland L., Duplan E., dos Santos L.R., et al. Therapeutic potential of parkin as a tumor suppressor via transcriptional control of cyclins in glioblastoma cell and animal models. *Theranostics*. 2021; 20(11): 10047. DOI:10.7150/THNO.57549.
  7. Younis R.M., Taylor R.M., Beardsley P.M., McClay J.L. The ANKS1B gene and its associated phenotypes: focus on CNS drug response. *Pharmacogenomics*. 2019; 20(9):669. DOI:10.2217/PGS-2019-0015.
  8. Shan D., Song Y., Zhang Y., et al. Neurexin dysfunction in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders: a PRIMSA-based systematic review through iPSC and animal models. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2024;18:1297374. doi: 10.3389/fnbeh.2024.1297374.
  9. Yoshida F., Nagatomo R., Utsunomiya S., et al. Soluble form of Lingo2, an autism spectrum disorder-associated molecule, functions as an excitatory synapse organizer in neurons. *Translational Psychiatry* 2024 14(1): 1–12. DOI:10.1038/s41398-024-03167-5.
  10. Menon P.J., Sambin S., Criniere-Boizet B., et al. Genotype–phenotype correlation in PRKN-associated Parkinson’s disease. *npj Parkinson’s Disease* 2024 10(1):1–12. DOI:10.1038/s41531-024-00677-3.
  11. Al Baradie R., Mir A., Alsaif A., et al. Epilepsy in patients with WWOX-related epileptic encephalopathy (WOREE) syndrome. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. 2022. 24(4): 697–712. DOI:10.1684/EPD.2022.1444.
  12. Oliver K.L., Trivisano M., Mandelstam S.A., et al. WWOX developmental and epileptic encephalopathy: Understanding the epileptology and the mortality risk. *Epilepsia*. 2023; 64(5):1351–1367. DOI:10.1111/EPI.17542.
  13. Fan Y., Goh E.L.K., Chan J.K.Y. Neural Cells for Neurodegenerative Diseases in Clinical Trials. *Stem Cells Translational Medicine*. 2023; 12(8):510–526. DOI:10.1093/STCLTM/SZAD041.