


Использование вектора на основе вируса Сендай для эффективной трансдукции фибробластов ластоногих

В.Р. Беклемишева¹, А.Г. Мензоров^{2, 3} 

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) млекопитающих расширило возможности изучения плюрипотентности и раннего эмбрионального развития. В литературе описаны ИПСК собаки (*Canis lupus familiaris*) и снежного леопарда (*Panthera uncia*), представителей отряда Carnivora. Ранее нами получены ИПСК американской норки (*Neovison vison*). Целью настоящего исследования был поиск условий для репрограммирования фибробластов ластоногих – представителей каноидной (Caniformia) ветви Хищных с консервативными геномами. Для создания ИПСК можно использовать различные системы доставки репрессирующих транскрипционных факторов (РНК, белки, плазмиды, векторы на основе вирусов и др.). Наиболее эффективные системы доставки для клеток мыши и человека основаны на применении различных вирусных векторов. Мы сравнили две системы доставки репрессирующих факторов: встраивающиеся в геном лентивирусные векторы и вектор на основе вируса Сендай – CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter. Преимущества векторов на основе вируса Сендай по сравнению с лентивирусами – отсутствие встройки в геном. Проведено тестирование доставки генетических конструкций, кодирующих флуоресцентный белок, на культурах фибробластов семи видов ластоногих: северного морского котика (*Callorhinus ursinus*), северного морского льва (*Eumetopias jubatus*), моржа (*Odobenus rosmarus*), морского зайца (*Erignathus barbatus*), байкальской нерпы (*Pusa sibirica*), кольчатой нерпы (*Phoca hispida*) и пестрой нерпы (*Phoca largha*). В качестве контроля были трансдуцированы фибробласты американской норки (*N. vison*), человека (*Homo sapiens*) и мыши (*Mus musculus*). Мы показали, что система трансдукции на основе вируса Сендай обеспечивает уровень экспрессии трансгена на один-два порядка выше, чем при использовании лентивирусов при сходном числе вирусов на клетку. Кроме того, экспрессия трансгена при применении вектора на основе вируса Сендай достаточно стабильна и незначительно изменяется на четвертый день трансдукции по сравнению со вторым днем. Полученные данные позволяют предположить, что трансдукция фибробластов ластоногих с помощью вируса Сендай предпочтительна для получения ИПСК ластоногих.

Ключевые слова: Хищные; тюлени; морж; репрограммирование; ИПСК; вирус Сендай; CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Беклемишева В.Р., Мензоров А.Г. Использование вектора на основе вируса Сендай для эффективной трансдукции фибробластов ластоногих. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ18.445

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Beklemisheva V.R., Menzorov A.G. Use of a Sendai virus-based vector for efficient transduction of pinniped fibroblasts. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1020-1025. DOI 10.18699/VJ18.445 (in Russian)

Received August 1, 2018
Revised October 27, 2018
Accepted October 28, 2018
© AUTHORS, 2018

 e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Use of a Sendai virus-based vector for efficient transduction of pinniped fibroblasts

V.R. Beklemisheva¹, A.G. Menzorov^{2, 3} 

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells expanded possibilities of pluripotency and early development studies. Generation of order Carnivora iPS cells from dog (*Canis lupus familiaris*), snow leopard (*Panthera uncia*), and American mink (*Neovison vison*) was previously reported. The aim of the current study was to examine conditions of pinniped fibroblast reprogramming. Pinnipeds are representatives of the suborder Caniformia sharing conservative genomes. There are several ways to deliver reprogramming transcription factors: RNA, proteins, plasmids, viral vectors etc. The most effective delivery systems for mouse and human cells are based on viral vectors. We compared a lentiviral vector which integrates into the genome and a Sendai virus-based vector, CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter. The main advantage of Sendai virus-based vectors is that they do not integrate into the genome. We performed delivery of genetic constructions carrying fluorescent proteins to fibroblasts of seven Pinnipeds: northern fur seal (*Callorhinus ursinus*), Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*), walrus (*Odobenus rosmarus*), bearded seal (*Erignathus barbatus*), Baikal seal (*Pusa sibirica*), ringed seal (*Phoca hispida*), and spotted seal (*Phoca largha*). We also transduced American mink (*N. vison*), human (*Homo sapiens*), and mouse (*Mus musculus*) fibroblasts as a control. We showed that the Sendai virus-based transduction system provides transgene expression one-two orders of magnitude higher than the lentiviral system at a comparable multiplicity of infection. Also, transgene expression after Sendai virus-based transduction is quite stable and changes only slightly at day four compared to day two. These data allow us to suggest that Sendai virus-based vectors are preferable for generation of Pinniped iPS cells.

Key words: Carnivora; seals; walrus; reprogramming; iPS cells; Sendai virus; CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) мыши (Takahashi, Yamana, 2006), человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) и нескольких других видов млекопитающих существенно упростило изучение эмбрионального развития и дифференцировки. Ранее были получены ИПСК таких представителей отряда Хищных, как собака (Shimada et al., 2010; Lee et al., 2011; Luo et al., 2011; Koh et al., 2012; Whitworth et al., 2012; Baird et al., 2015) и снежный леопард (Verma et al., 2012). Недавно мы получили ИПСК американской норки (Menzorov et al., 2015). Мы решили изучить возможность получения ИПСК другой группы Хищных – ластоногих. В качестве первого шага проведено тестирование на культурах фибробластов семи видов ластоногих двух систем доставки трансгенов: 1) встраивающиеся в геном лентивирусные векторы (система LeGO, <http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm>) и 2) вектор на основе вируса Сендай, работающий в цитоплазме (CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter).

Материалы и методы

Культивирование клеток. Использованы первичные культуры фибробластов ластоногих из Коллекции культур клеток Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Клеточные культуры получены из образцов тканей животных (биопсии либо некропии), обитающих в прибрежных водах Российской Федерации, – это северный морской котик (*Callorhinus ursinus*), северный морской лев (сивуч) (*Eumetopias jubatus*), морж (*Odobenus rosmarus*), морской заяц (лахтак) (*Erignathus barbatus*), байкальская нерпа (*Pusa sibirica*), кольчатая нерпа (акиба) (*Phoca hispida*), пестрая нерпа (ларга) (*Phoca largha*). Фибробласты американской норки (*Neovison vison*), человека (*Homo sapiens*) и эмбриональные фибробласты мыши (*Mus musculus*) (C57BL) получены в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепроцессуального и биомедицинского направления» Института цитологии и генетики СО РАН. Мыши линии C57BL для получения фибробластов были предоставлены ЦКП «SPF-виварий» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Культивирование фибробластов ластоногих аналогично описанному ранее для эмбриональных фибробластов американской норки, культивирование клеток Phoenix описано в работе (Присяжнюк, Мензоров, 2017). Фибробласты мыши и человека культивировали в среде для Phoenix.

Трансдукция клеток. Протокол трансдукции фибробластов лентивирусами представлен ранее (Присяжнюк, Мензоров, 2017). Трансдукцию фибробластов CytoTune EmGFP Sendai Fluorescence Reporter (CytoTune-EmGFP) (Thermo Fisher Scientific, Япония) проводили, согласно рекомендациям производителя.

Протокол эксперимента представлен на рис. 1 (а и б): за день до трансдукции фибробласты рассаживали на 24-луночное плато по 30 тыс. кл./см²; в день трансдукции подсчитывали клетки; на второй и четвертый дни проводили анализ флуоресценции на проточном цитофлуориметре.

Микроскопия. Анализ флуоресценции выполняли на флуоресцентном микроскопе Zeiss Observer.Z1 (Zeiss, Германия) с использованием камеры AxioCamHRm3_S603

в ЦКП «Клеточные технологии» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Изображения обрабатывали в программе ZEN 2 starter (Zeiss, Германия).

Цитофлуориметрия и анализ флуоресценции. Анализ флуоресценции фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре FACSAria (BD Bioscience, США) в ЦКП «Проточной цитометрии» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Значение флуоресценции (mean, среднее) трансдуцированных клеток не нормировали на флуоресценцию клеток без трансдукции, так как для клеток, не обработанных вирусами, значение флуоресценции было на один-три порядка ниже. Для измерения уровня флуоресценции клеток, обработанных вирусами, выставляли окно (gate) проточного цитофлуориметра так, чтобы 99.9 % нетрансдуцированных клеток не имели флуоресценции. Число вирусов на клетку (multiplicity of infection, MOI) рассчитывали следующим образом: $MOI = -\ln(1 - [\text{доля GFP+ клеток}])$. Среду с вирусным супернатантом при использовании в качестве вектора LeGO-G2 разбавляли в 20 раз, следовательно, реальный MOI был в 20 раз выше измеренного. Разбавление необходимо для того, чтобы увеличить точность измерения MOI. Так, при MOI = 1 ожидается, что 63.2 % клеток будут трансдуцированы, а для MOI = 4 – 98.2 %, что, с учетом ошибки проточного цитофлуориметра, не отличимо от более высокого MOI. Соответственно, реальное значение MOI для вектора LeGO-G2 рассчитывали путем умножения на 20 значения, полученного в эксперименте. Объем вируса CytoTune-EmGFP для трансдукции (день 0) рассчитывали в соответствии с рекомендациями производителя: $V \text{ (мкл)} = (MOI_{\text{selected}} \times N_{\text{expected}}) / (\text{Titer} \times 0.001)$, где MOI_{selected} – выбранное значение для трансдукции (2 и 7.5); N_{expected} – ожидаемое число клеток (60000); Titer – титр вируса, по данным производителя (10⁸). Далее рассчитывали ожидаемый MOI_{expected} , учитывая измеренное число клеток (N_{real}) для каждой культуры фибробластов: $MOI_{\text{expected}} = (V \times \text{Titer} \times 0.001) / N_{\text{real}}$. Для определения соотношения MOI_{expected} и MOI_{real} (получен в эксперименте) использовали среднее значение соотношения для $MOI_{\text{selected}} = 2$ и 7.5. Стандартное отклонение считали для двух экспериментальных значений MOI или средних значений флуоресценции. В случае отсутствия реплик стандартное отклонение средних значений флуоресценции брали из данных проточного цитофлуориметра.

Результаты

Анализ MOI. Схема эксперимента и примеры фотографий фибробластов на второй день после трансдукции представлены на рис. 1 (а–г). Примеры данных проточной цитофлуориметрии приведены на рис. 2 (а и б).

Фибробласты всех исследованных видов были успешно трансдуцированы с помощью CytoTune-EmGFP (см. рис. 2, в). Для всех культур MOI был ниже ожидаемого. Нужно отметить, что полученные для CytoTune-EmGFP значения MOI (0.3–2.3) в целом достаточны для получения ИПСК, при необходимости можно увеличить количество вирусных частиц до суммарного MOI = 2, так как в репрограммирующую систему CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit входят два вируса, несущих репрограммирующие факторы. Использование в качестве векторов LeGO-G2 позволило получить высокие значения

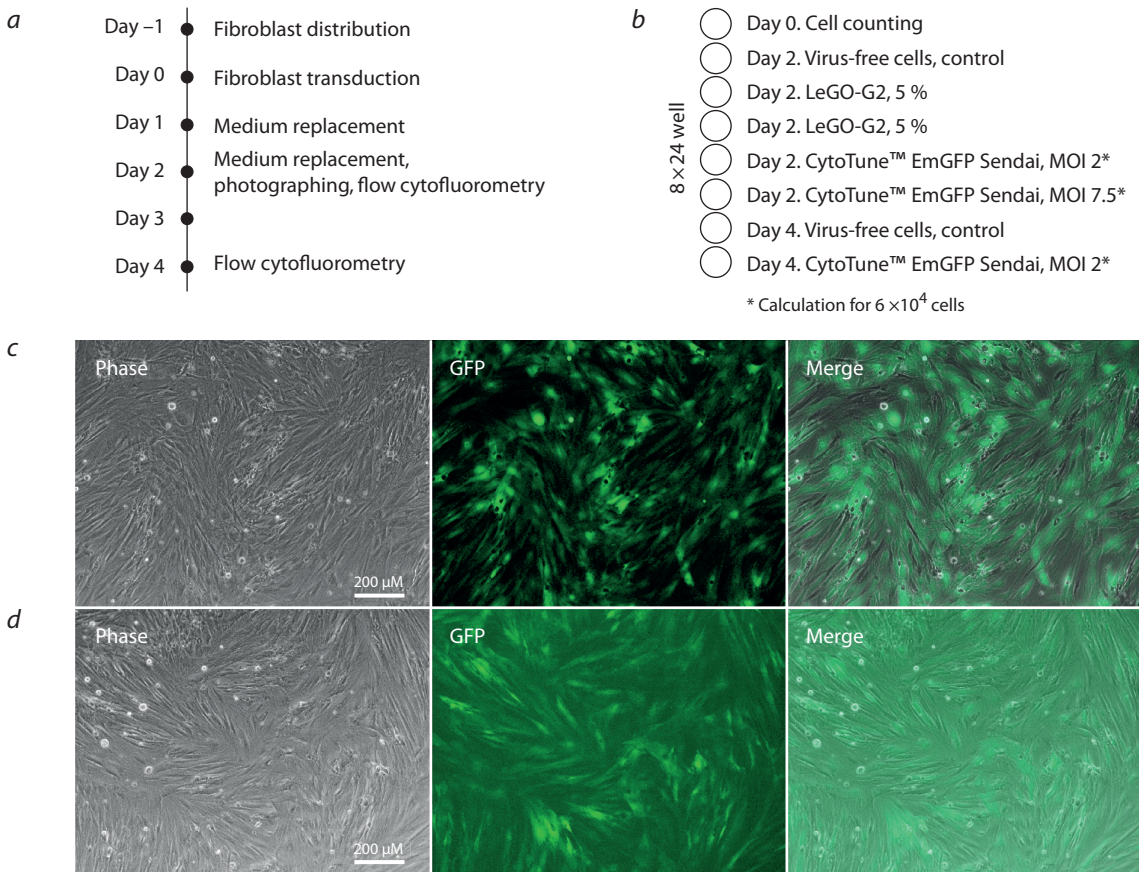


Fig. 1. Experimental design and fluorescent microscopy of fibroblasts.

(a) Experimental design. (b) Fibroblast transduction and analysis. (c) Day 2, bearded seal fibroblasts transduced with CytoTune™ EmGFP Sendai. (d) Day 2, bearded seal fibroblasts transduced with LeGO-G2.

MOI (см. рис. 2, *з*). Следует отметить очень низкое MOI для фибробластов моржа, независимая трансдукция подтвердила этот результат (данные не приведены).

Анализ флуоресценции. Значения флуоресценции GFP-позитивных клеток представлены на рис. 2 (*д* и *е*). Следует отметить, что увеличение MOI CytoTune-EmGFP в несколько раз приводит к незначительному увеличению флуоресценции (см. рис. 2, *д*). Аналогичный результат был получен для LeGO-G2 (данные не приведены).

Видно, что при сравнимых значениях MOI уровень флуоресценции для CytoTune-EmGFP на один-два порядка выше, чем для LeGO-G2 (см. рис. 2, *д* и *е*). Следует отметить, что, несмотря на низкий MOI, уровень флуоресценции GFP-позитивных фибробластов моржа сравним с флуоресценцией остальных культур клеток.

В отличие от лентивирусных векторов, векторы на основе вируса Сендай не встраиваются в геном, а находятся в цитоплазме, и, соответственно, при делении клеток разбавляются. Мы измерили уровень флуоресценции EmGFP на второй и четвертый дни (см. рис. 2, *ж*). Обнаружено, что уровень флуоресценции клеток на четвертый день сравним со таковым второго дня. Существенное падение отмечено только для фибробластов мыши (C57BL), что, вероятно, связано с их быстрым делением, и, соответственно, с быстрым уменьшением числа векторов в каждой клетке.

Высокое значение стандартного отклонения на рис. 2 (*д* и *ж*) связано с тем, что для этих измерений не было повторностей и стандартное отклонение было получено не из среднего по двум измерениям (как на рис. 2, *в*, *з*, *е*), а взято из данных проточного цитофлуориметра. Вариабельность флуоресценции объясняется различным количеством вирусных частиц, попадающих в индивидуальные клетки.

Обсуждение

Применение лентивирусов для получения ИПСК сопряжено с рисками. Во-первых, они встраиваются в геном и могут привести к нарушению экспрессии генов. Во-вторых, несмотря на замолкание ретровирусных трансгенов в ИПСК (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007), в некоторых случаях может происходить реактивация или неполное замолкание, приводящее к увеличению онкогенного потенциала и нарушению дифференцировки. Кроме того, при дифференцировке в некоторые типы клеток может происходить спонтанная реактивация трансгенов (Galat et al., 2016). Использование неинтегрирующихся в геном векторов позволяет решить эту проблему. Векторы на основе вируса Сендай эффективно заражают различные клетки млекопитающих и не встраиваются в геном, так как функционируют в цитоплазме (Li et al., 2000). Потенциальный недостаток этих

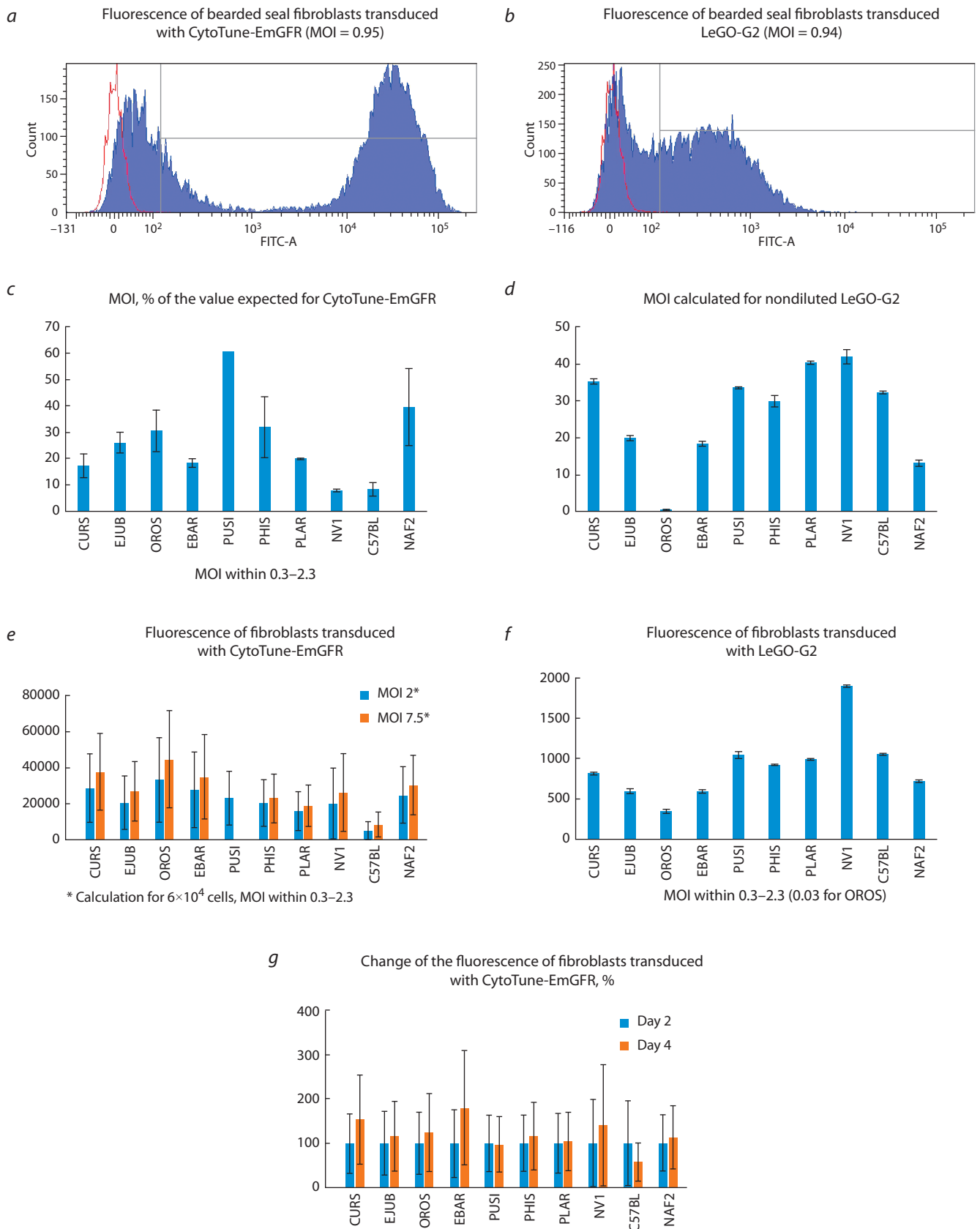


Fig. 2. Analysis of flow cytometry data. Standard deviation is calculated for two replicas (c, d, f) or taken from flow cytometer data for measurements without replicas (e, g).

CURS, northern fur seal (*Callorhinus ursinus*); EJUB, northern sea lion (*Eumetopias jubatus*); OROS, walrus (*Odobenus rosmarus*); EBAR, bearded seal (*Erignathus barbatus*); PUSI, Baikal seal (*Pusa sibirica*); PHIS, ringed seal (*Phoca hispida*); PLAR, spotted seal (*Phoca largha*); NV1, American mink (*Neovison vison*); C57BL, mouse (*Mus musculus*); NAF2, human (*Homo sapiens*).

векторов – после первой трансдукции клетки приобретают резистентность к вирусу. Ранее с помощью векторов на основе вируса Сендай были получены ИПСК человека (Fusaki et al., 2009), макаки-крабоведа (Corpiello et al., 2017), макаки-резус (Lu et al., 2013), шимпанзе (Fugie et al., 2014), собаки (Tsukamoto et al., 2018) и мыши (Tucker et al., 2013). Описаны также ИПСК-подобные колонии байкальской нерпы и сивуча (Борода и др., 2015), хотя из статьи неясно, использовали ли авторы векторы на основе ретровирусов или Сендай.

Мы впервые применили систему трансдукции на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP для фибробластов пяти видов ластоногих: северного морского котика, моржа, морского зайца (лахтака), кольчатой нерпы (акибы), пестрой нерпы (ларги). Показана возможность трансдукции фибробластов северного морского льва (сивуча), байкальской нерпы и американской норки. Сравнение флуоресценции EGFP (лентивирусный вектор LeGO-G2) и EmGFP (вектор на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP) выявило, что для CytoTune-EmGFP флуоресценция выше на один-два порядка. Яркость EmGFP при тестировании составляет 116 % от EGFP (Cubitt et al., 1999), что не может объяснить полученную разницу. Кроме того, на четвертый день после трансдукции мы не наблюдали снижения уровня флуоресценции. Это позволяет предположить, что, как и в случае клеток человека, использование CytoTune-iPS 2.0 репрограммирующего набора, основанного на том же векторе, что и CytoTune-EmGFP, позволит эффективно экспрессировать репрограммирующие факторы для получения ИПСК.

Для репрограммирования необходима достаточно длительная экспрессия транскрипционных факторов. Лентивирусные векторы при репрограммировании клеток экспрессируются постоянно, до образования ИПСК. Затем, в плюрипотентных клетках, лентивирусные векторы подвергаются замолканию. При использовании для репрограммирования систем на основе вируса Сендай происходит постепенное разбавление вируса при делении клеток. Так, примерно к 10-му пассажу можно ожидать отсутствия трансгенов (Fusaki et al., 2009; Van et al., 2011).

Уровень экспрессии трансгенов в случае использования систем доставки на основе вируса Сендай значительно выше, чем при применении лентивирусов. С помощью векторов на основе вируса Сендай были получены ИПСК различных видов, в том числе человека и мыши, это позволяет сделать вывод, что для получения ИПСК уровень экспрессии трансгенов может варьировать в широких пределах. Интересно отметить, что для поддержания плюрипотентности нужен определенный уровень экспрессии факторов, контролирующих плюрипотентность. Например, ранее было показано, что уменьшение или увеличение экспрессии *Oct4* в эмбриональных стволовых клетках мыши приводило к их дифференцировке (Niwa et al., 2000). В дальнейшем было установлено, что стабильное поддержание плюрипотентности возможно и при сниженной экспрессии *Oct4* (Karwacki-Neisius et al., 2013). Следует отметить, что, независимо от уровня экспрессии трансгенов в процессе получения ИПСК, в успешно полученных плюрипотентных клетках трансгены замолкают или элиминируются, так что в поддержании

плюрипотентности участвуют только эндогенные транскрипционные факторы.

Следует отметить крайне низкую эффективность трансдукции фибробластов моржа (см. рис. 2, з). Лентивирусные векторы третьего поколения, псевдотипированные гликопротеином VSV-G, имеют высокую тропность к клеткам млекопитающих (Cronin et al., 2005). Возможно, фибробласты, использованные нами в опыте, не имеют на поверхности необходимого для заражения рецептора.

Таким образом, проведено тестирование эффективности трансдукции фибробластов ластоногих вектором на основе вируса Сендай CytoTune-EmGFP. Мы наблюдали МОИ порядка единицы, что достаточно для использования системы на основе вируса Сендай для получения ИПСК. Уровень флуоресценции репортерного гена EmGFP превышал таковой для EGFP лентивирусной системы на один-два порядка и не снижался на четвертый день после трансдукции. В целом полученные данные позволяют предположить, что использование системы трансдукции фибробластов ластоногих на основе вируса Сендай предпочтительно для получения ИПСК ластоногих.

Acknowledgements

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00644, and State Budgeted Project 0324-2018-0016. The authors are grateful to the staffs of the Shared Access Centers Flow Cytometry and SPF Vivarium, ICG (projects RFMEFI61914X0005 and RFMEFI62114X0010). Part of the experiments were conducted at the Shared Access Center Collection of Pluripotent Cell Cultures of the Human and Mammals for General Biology and Biomedicine, ICG (<http://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). Primary cultures of pinniped fibroblasts were obtained from the Collection of Cell Cultures for General Biology (State Budgeted Project 0310-2016-0002), Department of the Diversity and Evolution of Genomes, IMCB.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Борода А.В., Питерсон С.Е., Монтэгу С.К., Пиварофф К.Дж., Штейн Дж., Ли Ч.Я., Лорин Дж.Ф., Одинцова Н.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из замороженных в жидком азоте биоптатов кожи байкальской нерпы (*Pusa sibirica*) и сивуча (*Eumetopias jubatus*). Морские млекопитающие Голарктики. Сб. науч. тр. по матер. VIII междунар. конф. Санкт-Петербург, 22-27 сентября 2014 г. М., 2015;1:73-77. [Boroda A.V., Peterson S.E., Montague S.C., Pivaroff C.G., Stein J.W., Lee C.-Y., Loring J.F., Odintsova N.A. Generating induced pluripotent stem cells from cryopreserved skin biopsies of Lake Baikal seal (*Pusa sibirica*) and Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*). Proceedings of the VIII International Conference "Marine Mammals of the Holarctic", St. Petersburg, Sept. 22–27, 2014, Vol. 1. Moscow, 2015:73-77. (in Russian)]
- Пристяжнюк И.Е., Мензоров А.Г. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки: протокол. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288.
- [Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol. Vavilovskii Zhurnal Gene-

- tiki i Selektсии = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017; 21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288 (in Russian)]
- Baird A., Barsby T., Guest D.J. Derivation of canine induced pluripotent stem cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2015;50(4):669-676. DOI 10.1111/rda.12562.
- Ban H., Nishishita N., Fusaki N., Tabata T., Saeki K., Shikamura M., Takada N., Inoue M., Hasegawa M., Kawamata S., Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(34):14234-14239. DOI 10.1073/pnas.1103509108.
- Coppiello G., Abizanda G., Aguado N., Iglesias E., Arellano-Viera E., Rodriguez-Madoz J.R., Carvajal-Vergara X., Prosper F., Aranguren X.L. Generation of *Macaca fascicularis* iPSC cell line ATCi-MF1 from adult skin fibroblasts using non-integrative Sendai viruses. *Stem Cell Res.* 2017;21:1-4. DOI 10.1016/j.scr.2017.03.008.
- Cronin J., Zhang X.Y., Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 2005;5(4):387-398.
- Cubitt A.B., Woollenweber L.A., Heim R. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Met. Cell Biol.* 1999;58:19-30.
- Fujie Y., Fusaki N., Katayama T., Hamasaki M., Soejima Y., Soga M., Ban H., Hasegawa M., Yamashita S., Kimura S., Suzuki S., Matsuzawa T., Akari H., Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPSCs derived from chimpanzee blood. *PLoS One.* 2014;9(12):e113052. DOI 10.1371/journal.pone.0113052.
- Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2009; 85(8):348-362.
- Galat V., Galat Y., Perepitchka M., Jennings L.J., Iannaccone P.M., Hendrix M.J. Transgene reactivation in induced pluripotent stem cell derivatives and reversion to pluripotency of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2016; 25(14):1060-1072. DOI 10.1089/scd.2015.0366.
- Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R., Halbritter F., Ng J.H., Weiße A.Y., Wong F.C., Gagliardi A., Mullin N.P., Festuccia N., Colby D., Tomlinson S.R., Ng H.H., Chambers I. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell.* 2013;12(5):531-545. DOI 10.1016/j.stem.2013.04.023.
- Koh S., Thomas R., Tsai S., Bischoff S., Lim J.-H., Breen M., Olby N.J., Piedrahita J.A. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from adult canine fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2012;22(6):951-963. DOI 10.1089/scd.2012.0393.
- Lee A.S., Xu D., Plews J.R., Nguyen P.K., Nag D., Lyons J.K., Han L., Hu S., Lan F., Liu J., Huang M., Narsinh K.H., Long C.T., de Almeida P.E., Levi B., Kooreman N., Bangs C., Pacharinsak C., Ikeno F., Yeung A.C., Gambhir S.S., Robbins R.C., Longaker M.T., Wu J.C. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(37):32697-32704. DOI 10.1074/jbc.M111.235739.
- Li H.O., Zhu Y.F., Asakawa M., Kuma H., Hirata T., Ueda Y., Lee Y.S., Fukumura M., Iida A., Kato A., Nagai Y., Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* 2000;74(14):6564-6569.
- Lu J., Liu H., Huang C.T., Chen H., Du Z., Liu Y., Sherfat M.A., Zhang S.C. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts. *Cell Rep.* 2013;3(5):1580-1591. DOI 10.1016/j.celrep.2013.04.004.
- Luo J., Suhr S.T., Chang E.A., Wang K., Ross P.J., Nelson L.L., Venta P.J., Knott J.G., Cibelli J.B. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(10):1669-1678. DOI 10.1089/scd.2011.0127.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 2007;1(1):55-70. DOI 10.1016/j.stem.2007.05.014.
- Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Ciraera S., Anistoroaei R., Serov O.L. Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes. *BMC Genomics.* 2015;16(Suppl. 13):S6. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S6.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000;24(4):372-376. DOI 10.1038/74199.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007;448:313-317. DOI 10.1038/nature05934.
- Shimada H., Nakada A., Hashimoto Y., Shigeno K., Shionoya Y., Nakamura T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.* 2010;77(1):2. DOI 10.1002/mrd.21117.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2007;2(12): 3081-3089. DOI 10.1038/nprot.2007.418.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tsukamoto M., Nishimura T., Yodoe K., Kanegi R., Tsujimoto Y., Alam M.E., Kuramochi M., Kuwamura M., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Inaba T., Sugiura K., Hatoya S. Generation of footprint-free canine induced pluripotent stem cells using auto-erasable Sendai virus vector. *Stem Cells Dev.* 2018;27(22):1577-1586. [Epub ahead of print]. DOI 10.1089/scd.2018.0084.
- Tucker B.A., Anfinson K.R., Mullins R.F., Stone E.M., Young M.J. Use of a synthetic xeno-free culture substrate for induced pluripotent stem cell induction and retinal differentiation. *Stem Cells Transl. Med.* 2013;2(1):16-24. DOI 10.5966/sctm.2012-0040.
- Verma R., Holland M.K., Temple-Smith P., Verma P.J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology.* 2012;77(1):220-228, 228.e221-222. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.09.022.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007;448: 318-324. DOI 10.1038/nature05944.
- Whitworth D.J., Ovchinnikov D.A., Wolvetang E.J. Generation and Characterization of LIF-dependent canine induced pluripotent stem cells from adult dermal Fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2012;21(12): 2288-2297. DOI 10.1089/scd.2011.0608.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920. DOI 10.1126/science.1151526.