

# Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА

## CRISPR-2023

Академгородок, Новосибирск, Россия  
11–13 сентября 2023 года

[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)

---

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

# Genes & Cells

---

Vol. XVIII, Appendix, 2023

---

---

ISSN 2313-1829

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# Гены & Клетки

---

Том XVIII, Приложение, 2023

Журнал рекомендован ВАК Министерства образования  
и науки РФ для публикации основных научных  
результатов диссертаций на соискание  
ученой степени доктора и кандидата наук

Журнал включен в российские и международные  
библиографические и реферативные базы данных:  
eLIBRARY ([www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)), Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com))

---

# EDITORIAL COUNCIL

## Editor-in-Chief

M.A. Lagarkova  
Lopukhin Federal Research and Clinical Center  
of Physical-Chemical Medicine (Moscow)  
Lomonosov Moscow State University (Moscow)

## Executive Editor

R.V. Deev  
Human Stem Cells Institute (Moscow)  
I.I. Mechnikov North-Western State Medical University  
(Saint Petersburg)

## Editorial Board:

### V.S. Akatov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

### V.P. Baklaushev

Federal Scientific and Clinical Center, FMBA of Russia (Moscow)

### A.S. Bryukhovetsky

Central Clinical Hospital of the RAS (Moscow)

### R.K. Chailakhian

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology  
and Microbiology (Moscow)

### I.A. Chekmareva

A.V. Vishnevskiy Institute of Surgery (Moscow)

### V.S. Chirsky

S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

### G.D. Dalgatov

Federal Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology  
FMBA of Russia (Moscow)

### M.I. Davydov

(Moscow)

### A.A. Doctorov

Research and Training Center of Biomedical  
Technologies RRIMAP of RAAS (Moscow)

### P.A. Dyban

Scientific Research Institute of Experimental  
Medicine, (Saint-Petersburg)

### T.H. Fathudinov

Research Institute of Human Morphology (Moscow)

### V.G. Gololobov

S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

### Y.P. Gribunov

Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center of the Business  
Administration for the President of the Russian Federation (Moscow)

### A.A. Gumerova

Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

### R.E. Kalinin

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

### A.P. Kiasov

Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

### S.L. Kiselev

N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS (Moscow)

### K.V. Kotenko

B.V. Petrovsky Russian Research Centre of Surgery (Moscow)

### V.A. Kozlov

Research Institute of Clinical Immunology (Novosibirsk)

### A. Kuliev

Florida International University (Miami, USA)

### A.V. Kulikov

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

### V.S. Komlev

A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS (Moscow)

## Editorial Board:

S.N. Bardakov (Saint-Petersburg)  
A.V. Bersenev (San-Francisco, USA)  
A.G. Chogovadze (Moscow)  
A.Y. Efimenko (Moscow)  
I.I. Eremin (Moscow)  
G. Feichtinger (Vienna, Austria)  
P.I. Makarevich (Moscow)  
I.V. Potapov (Moscow)  
O.V. Tyumina (Samara)  
N.V. Tsupkina (Saint-Petersburg)

### A.A. Maschan

D. Rogachev Federal Scientific and Clinical Center for Pediatric  
Hematology, Oncology and Immunology (Moscow)

### S.A. Matveev

N.I. Pirogov National Medical-Surgical Center (Moscow)

### G.L. Mentkevich

"Neurovita" Clinic (Moscow)

### Sh.M. Mitalipov

Oregon Health and Science University (Beaverton, USA)

### I.A. Odintsova

S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

### N.A. Onishchenko

V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation  
and Artificial Organs (Moscow)

### O.V. Paklina

Doctor of medical sciences

### Ye.V. Parfyonova

National Medical Research Center of Cardiology (Moscow)

### A.S. Pavliuk

Research Institute of Eye Diseases (Moscow)

### Yu.A. Petrenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of NAS of Ukraine (Kharkov, UA)

### A.G. Popandopulo

V. Gusak Institute Emergency and  
Reconstructionist Surgery (Donetsk)

### A.V. Prikhodko

Gemabank (Moscow)

### S.A. Rumyantsev

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow)

### S.V. Sazonov

Ural State Medical University (Ekaterinburg)

### N.S. Sergeeva

P.A. Herzen Moscow Oncological Research Institute (Moscow)

### E.I. Shishatskaya

Institute of Biophysics SB RAS (Krasnoyarsk)

### E.V. Skorobogatova

Russian clinical children hospital (Moscow)

### I.A. Suchkov

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

### A.N. Tomilin

Institute of Cytology of RAS (Saint-Petersburg)

### V.V. Tsymbereg

"Biovitrum" Co. Ltd. (Saint-Petersburg)

### S.E. Voskanyan

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical  
Center of FMBA of Russia (Moscow)

### S.M. Zakian

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk)

### V.L. Zorin

Human Stem Cells Institute (Moscow)

---

# РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

## Главный редактор

**М.А. Лагарькова**  
Федеральный научно-клинический центр физико-химической  
медицины им. Ю.М. Лопухина (Москва)  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Москва)

## Ответственный редактор

**Р.В. Деев**  
ПАО «Артген» (Москва)  
Северо-Западный государственный медицинский университет  
им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург)

## Участники редакционного совета:

**В.С. Акатов**  
Институт теоретической и экспериментальной  
биофизики РАН (Пушино, Московская обл.)

**В.П. Баклаушев**  
Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

**А.С. Брюховецкий**  
Центральная клиническая больница РАН (Москва)

**С.Э. Восканян**  
Федеральный медицинский биофизический центр  
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

**В.Г. Гололобов**  
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

**Ю.П. Грибунов**  
Центральная клиническая больница с поликлиникой  
Управления делами президента РФ (Москва)

**А.А. Гумерова**  
Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

**М.И. Давыдов**  
(Москва)

**Г.Д. Далгатов**  
Федеральный научно-клинический центр  
оториноларингологии ФМБА России (Москва)

**А.А. Докторов**  
Научно-исследовательский и учебно-методический центр  
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

**П.А. Дыбан**  
Научно-исследовательский институт экспериментальной  
медицины (Санкт-Петербург)

**С.М. Закиян**  
Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)

**В.Л. Зорин**  
Институт стволовых клеток человека (Москва)

**Р.Е. Калинин**  
Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

**А.П. Киясов**  
Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

**С.Л. Киселев**  
Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова (Москва)

**К.В. Котенко**  
Российский научный центр хирургии им. Б.В. Петровского (Москва)

**В.А. Козлов**  
НИИ клинической иммунологии (Новосибирск)

**А. Кулиев**  
Международный университет Флориды (Майами, США)

**А.В. Куликов**  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино)

**В.С. Комлев**  
Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (Москва)

**А.А. Масчан**  
Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (Москва)

Адрес редакции:  
119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 2, а/я 373  
Тел./факс: +7 (495) 734-91-70. E-mail: redactor@genescells.ru

Присылать материал для публикации, ознакомиться  
с правилами для авторов, оформить подписку можно  
в Интернете по адресу: [www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)  
+7(495) 646-80-76

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору  
за соблюдением законодательства в сфере массовых  
коммуникаций и охране культурного наследия

Свидетельство о регистрации ПИ № 77 – 57156 от 11.03.2014 г.

ISSN 2313-1829

Электронная версия журнала [www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)  
ISSN электронной версии: 2500-2562

## Редакционная коллегия:

**С.Н. Бардаков** (Санкт-Петербург)  
**А.В. Берсенев** (Сан-Франциско, США)  
**И.И. Еремин** (Москва)  
**А.Ю. Ефименко** (Москва)  
**П.И. Макаревич** (Москва)  
**И.В. Потапов** (Москва)  
**О.В. Тюмина** (Самара)  
**Г. Файштингер** (Вена, Австрия)  
**Н.В. Цупкина** (Санкт-Петербург)  
**А.Г. Чоговадзе** (Москва)

**С.А. Матвеев**  
Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова (Москва)

**Г.Л. Менткевич**  
Клиника «Нейровита» (Москва)

**Ш.М. Миталипов**  
Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

**И.А. Одинцова**  
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

**Н.А. Онищенко**  
Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных  
органов им. академика В.И. Шумакова (Москва)

**А.С. Павлюк**  
Российский национальный медицинский  
университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

**О.В. Паклина**  
Городская клиническая больница им. С.П. Боткина (Москва)

**Е.В. Парфенова**  
Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии (Москва)

**Ю.А. Петренко**  
Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины (Харьков, Украина)

**А.Г. Попандопуло**  
Институт неотложной и восстановительной  
хирургии им. В.К. Гусака (Донецк)

**А.В. Приходько**  
Гемабанк (Москва)

**С.А. Румянцев**  
Российский национальный исследовательский медицинский  
университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

**С.В. Сазонов**  
Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург)

**Н.С. Сергеева**  
Московский научно-исследовательский онкологический  
институт им. П.А. Герцена (Москва)

**Е.В. Скоробогатова**  
Российская детская клиническая больница (Москва)

**И.А. Сучков**  
Рязанский государственный медицинский  
университет им. И.П. Павлова (Рязань)

**А.Н. Томилин**  
Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)

**Т.Х. Фатхудинов**  
Научно-исследовательский институт морфологии человека (Москва)

**Р.К. Чайлахян**  
НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)

**И.А. Чекмарева,**  
Институт хирургии им. А.В. Вишневского (Москва)

**В.С. Чирский**  
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

**В.В. Цимберг**  
ООО «БиоВитрум» (Санкт-Петербург)

**Е.И. Шишацкая**  
Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Свидетельство о регистрации  
Эл № ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И.А. Яковлев  
Верстка С.А. Климентовский

Подписано в печать 05.09.2023.

**Материалы конференции, списки цитируемой литературы  
опубликованы с сохранением орфографии и пунктуации авторов.**

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся  
в настоящем издании, допускается с письменного разрешения  
редакции. Ссылка на журнал «Гены и клетки» обязательна.

# МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА CRISPR-2023

Академгородок, Новосибирск, Россия  
11–13 сентября 2023 года

Научный редактор сборника — д. б. н., профессор **С.М. Закиян**  
Технический редактор сборника — к. м. н. **Р.В. Деев**  
Техническая подготовка материалов и тезисов:  
к. б. н. **Е.В. Дементьева**, к. б. н. **И.С. Захарова**

*(сохранены авторские орфография, пунктуация и терминология)*

## УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕМБРАНЫ КОЛЛАГЕНОВОЙ VISCOLL® ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РОГОВИЦЫ В IN VIVO МОДЕЛЯХ

**А.Ю. Андреев<sup>1,2,3\*</sup>, Е.О. Осидак<sup>1,4</sup>,  
С.Э. Аветисов<sup>2,3</sup>, С.П. Домогатский<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup> ООО фирмы «Имтек»

121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
глазных болезней»

119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11 А,Б

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России

119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>4</sup> ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России

117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

<sup>5</sup> ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова»  
МЗ РФ Минздрава России

121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А

\*e-mail: docandreev@gmail.com

**Ключевые слова:** роговица, Viscoll, коллагеновая мембрана, кератопластика, офтальмология.

Пересадка донорской роговицы является наиболее распространённым методом хирургического лечения большинства заболеваний роговицы, однако глобальный дефицит донорских тканей существенно осложняет его использование. Таким образом, для решения этой проблемы необходима разработка альтернативных подходов, основанных на тканевой инженерии и регенеративной медицине.

В данной работе мы создали прочную, прозрачную, биосовместимую коллагеновую мембрану, используя только высококонцентрированный раствор коллагена (коллаген Viscoll) без использования химических сшивок. Мы провели исследования in vitro и in vivo, чтобы проверить ее эффективность для регенерации поврежденной роговицы.

Механические свойства коллагеновой мембраны Viscoll (далее мембрана) сравнимы со свойствами нормальной роговицы. Имплантация мембраны в карман роговицы кролика привела к увеличению общей толщины роговицы и ее прочностных характеристик, а также к сохранению прозрачности в течение шести месяцев после операции [1]. В следующем исследовании после удаления части стромы мембрану имплантировали внутрь роговицы кроликов. Через 6 месяцев была отмечена активная миграция клеток хозяина в имплантированный материал, при этом прозрачность роговицы сохранялась у всех экспериментальных животных. Эффективная интеграция мембраны с тканями роговицы способствовала регенерации нервов in vivo, что подтвердили данные конфокальной микроскопии in vivo [2].

Таким образом была продемонстрирована безопасность и эффективность коллагеновой мембраны Viscoll для регенерации стромы роговицы. Помимо отличных оптических и механических свойств, мембрана способствует активной миграции клеток и может быть имплантирован в строму роговицы с использованием инструментов и методик, имитирующих те, которые применяются при кератопластике роговицы человека. С учётом того, что данное медицинское изделие было допущено Росздравнадзором РФ для проведения клинических испытаний можно сделать вывод, что коллагеновая мембрана Viscoll имеет реальный потенциал для решения глобальной проблемы нехватки донорских тканей для лечения роговичной слепоты. Источники финансирования: Проект был поддержан Фондом Содействия Инновациям договор № 793ГКСС7-15/79518.

#### Литература

1. Andreev AY, Osidak EO, Grigoriev TE et al. A new collagen scaffold for the improvement of corneal biomechanical properties in a rabbit model. *Exp Eye Res.* 2021;207:108580. doi: 10.1016/j.exer.2021.10858.
2. Osidak EO, Andreev AY, Avetisov SE et al. Corneal stroma regeneration with collagen-based hydrogel as an artificial stroma equivalent: a comprehensive in vivo study. *Polymers.* 2022;14(19):4017. doi: 10.3390/polym14194017.

## PERFORMANCE ASSESSMENT OF VISCOLL COLLAGEN MEMBRANE FOR REGENERATION OF CORNEA IN THE IN VIVO MODELS

A.Yu. Andreev<sup>1,2,3\*</sup>, E.O. Osidak<sup>1,4</sup>,  
S.E. Avetisov<sup>2,3</sup>, S.P. Domogatsky<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Imtek Ltd.  
121552, Moscow, Akademika Chazova st., 15A

<sup>2</sup> Research Institute of Eye Disease  
119021, Moscow, 11A Rossolimo St.

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
Ministry of Health of the Russian Federation  
119991, Moscow, 8-2 Trubetskaya Str.

<sup>4</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center  
of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology  
Ministry of Health of the Russian Federation  
117997, Moscow, 1 Samory Mashela str.

<sup>5</sup> FSBI «NMRCC named after academian E.I. Chazov»  
Ministry of Health of the Russian Federation  
121552, Moscow, Akademika Chazova st., 15A

\*e-mail: docandreev@gmail.com

**Keywords:** cornea, Viscoll, collagen membrane, keratoplasty, ophthalmology.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ ИСКУССТВЕННЫХ мРНК ЛИПОСОМАМИ 2X3-DOPE И 2X7-DOPE НА МОДЕЛЯХ IN VITRO И IN VIVO

Д.Н. Антропов<sup>1</sup>, А.С. ДOME<sup>1</sup>, О.В. Марков<sup>1</sup>,  
Д.В. Гладких<sup>1</sup>, А.М. Матвеева<sup>1</sup>, А.Р. Валитова<sup>1</sup>,  
Е.С. Журавлев<sup>1</sup>, В.М. Голышев<sup>1</sup>, П.А. Пучков<sup>2</sup>,  
Д.М. Макарова<sup>2</sup>, М.А. Маслов<sup>2</sup>, Г.А. Степанов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Институт тонких химических технологий им.

М.В. Ломоносова, МИРЭА — Российский

технологический университет

119571, Москва, просп. Вернадского, 86

\*e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** искусственные мРНК, катионные липосомы, доставка мРНК.

В настоящее время происходит активное развитие направления по созданию терапевтических агентов и вакцин на основе мРНК. При этом эффективность доставки является одной из ключевых проблем при разработке препаратов на основе РНК.

В своем исследовании мы разработали стратегию синтеза функциональных мРНК. В первую очередь, нами были получены мРНК репортерных генов, а именно, зеленого флуоресцентного белка (GFP), красного флуоресцентного белка mKate2 и люциферазы светлячка (FLuc). Полученные искусственные мРНК содержали модификации в виде псевдоуридина и 5'-кэпов, а также последовательности UTR, фланкирующие рамку считывания с 5'- и 3'-конца. Реализованная схема синтеза мРНК включала также стадии обработки фосфатазой и ферментативного полиаденилирования. Было показано, что при трансфекции мРНК GFP и mKate2 в концентрации 0,5–8,0 мкг/мл удается детектировать флуоресценцию в клетках человека. Функциональность мРНК FLuc была подтверждена при трансфекции с последующим лизисом клеток через 24 ч и проведением стандартной люциферин-люциферазной реакции.

С использованием полученных репортерных мРНК мы проводили скрининг липосом на основе поликатионных амфифилов 2X3 и 2X7 и липида-хэлпера DOPE по эффективности доставки искусственных мРНК в клетки человека. Предварительно проводили физико-химический анализ, оценку размера и ζ-потенциала липоплексов методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии. При трансфекции клеток человека полученными мРНК липосомы 2X3-DOPE (1:2) и 2X3-DOPE (1:3) демонстрировали наилучшие результаты, сравнимые с эффективностью доставки мРНК коммерческими трансфицирующими агентами. Для выбранных типов липосом была проведена оценка доставки мРНК FLuc in vivo. Показано, что при использовании маннозилированных вариантов липосом 2X3:DOPE in vivo сигнал детектируется через 4 часа после подкожного введения и сохраняется до 3 суток. Таким образом, исследуемые липосомы являются перспективным средством доставки мРНК-препаратов. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-75-10153.

## STUDY OF THE EFFICIENCY OF ARTIFICIAL MRNA DELIVERY BY 2X3-DOPE AND 2X7-DOPE LIPOSOMES IN VITRO AND IN VIVO

D.N. Antropov<sup>1</sup>, A.S. Dome<sup>1</sup>, O.V. Markov<sup>1</sup>,  
D.V. Gladkikh<sup>1</sup>, A.M. Matveeva<sup>1</sup>, A.R. Valitova<sup>1</sup>,  
E.S. Zhuravlev<sup>1</sup>, V.M. Golyshev<sup>1</sup>, P.A. Puchkov<sup>2</sup>,  
D.M. Makarova<sup>2</sup>, M.A. Maslov<sup>2</sup>, G.A. Stepanov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 8

<sup>2</sup> Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow  
Technological University

119571, Moscow, Vernadsky Ave. 86

\*e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

**Keywords:** artificial mRNAs, cationic liposomes, mRNA delivery.

## РЕГУЛЯЦИЯ ПУЛА АКТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕВЕРСИИ ФИБРОЗА

Н.А. Басалова<sup>1,2\*</sup>, О.А. Григорьева<sup>1,2</sup>,  
А.Е. Толстолужинская<sup>1,2</sup>, У.Д. Дьячкова<sup>1,2</sup>,  
М.А. Виговский<sup>1,2</sup>, М.А. Кулебякина<sup>2</sup>,  
А.Е. Толстолужинская<sup>1,2</sup>, В.С. Попов<sup>1,2</sup>,  
Н.И. Калинина<sup>2</sup>, Ж.А. Акопян<sup>1,2</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, Медицинский  
научно-образовательный центр, МГУ имени  
М.В. Ломоносова

119192, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины,  
Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова

119991, Москва, Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

\*e-mail: basalovana@my.msu.ru

**Ключевые слова:** миофибробласты, белок активации фибробластов, FAPa, фиброз, фибротический фокус, микроРНК, внеклеточные везикулы, мезенхимные стромальные клетки.

Развитие фиброза является наиболее частым исходом репаративной регенерации у человека. При обширном или хроническом повреждении фиброз может принимать прогрессирующий характер, что приводит к постепенному замещению функциональной ткани органа фиброзной вплоть до полной дисфункции органа. Ввиду этого одной из важнейших задач регенеративной биомедицины является изучение механизмов прогрессии фиброза с целью поиска эффективных мишеней его подавления и реверсии.

Основными эффекторными клетками фиброза длительное время считали миофибробласты. Однако сегодня наряду с миофибробластами перспективной клеточной мишенью для регуляции фиброза считают пул клеток, называемых активированными фибробластами. Именно эти клетки, маркером которых является белок активации фибробластов FAPa, за счёт своей высокой пролиферативной и инвазивной активности, а также способности быстро дифференцироваться в миофибробласты, обеспечивают прогрессивное течение фиброза. Возможности регуляции данного пула клеток на сегодняшний день остаются малоизученными. Поскольку мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают способностью к регуляции фиброза через перенос микроРНК в составе внеклеточных везикул (ВВ), многообещающим направлением исследования является изучение влияния ВВ МСК на возможность управления пулом активированных FAPa+ фибробластов.

Для изучения данного вопроса ВВ выделяли из секрета МСК человека и характеризовали согласно критериям MISEV 2018. Ингибирование микроРНК проводили путём трансфекции ВВ МСК синтетическими олигонуклеотидами. Эффект ВВ МСК оценивали на модели блеомин-индуцированного фиброза лёгких у мышей C57Bl/6, а также на *in vitro* моделях TGF $\beta$ -индуцированной дифференцировки фибробластов и дедифференцировки миофибробластов человека.

Нами было показано, что у мышей при введении ВВ МСК достоверно уменьшалась более, чем в два раза, как площадь депонированного коллагена в лёгких, так и выраженность признаков фиброза согласно шкале Эшкрофта. В то же время площадь функциональной легочной ткани, сохранившей альвеолярную структуру, увеличилась на 40–45% по сравнению с контрольными группами. Мы показали, что *in vivo* ВВ МСК стимулировали не только дедифференцировку миофибробластов, но и снижали количество их активированных FAPa+ предшественников до уровня, наблюдаемого в интактной группе. С помощью ингибиторного анализа *in vitro* мы показали, что одним из возможных агентов, переносимых в составе ВВ-МСК и ответственными за уменьшение экспрессии FAPa+ в активированных фибробластах, является микроРНК-29с.

Таким образом мы показали, что пул активированных FAPa+ клеток может регулироваться МСК. Одним из ключевых молекулярных механизмов данного процесса может являться перенос микроРНК, в том числе микроРНК-29с, в составе ВВ-МСК. Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>.

## REGULATION OF ACTIVATED FIBROBLASTS BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS AS A POSSIBLE MECHANISM OF FIBROSIS RESOLUTION

N.A. Basalova<sup>1,2\*</sup>, O.A. Grigorieva<sup>1,2</sup>, A.E. Tolstoluzhinskaya<sup>1,2</sup>, U.D. Dyachkova<sup>1,2</sup>, M.A. Vigovskiy<sup>1,2</sup>, M.A. Kulebyakina<sup>2</sup>, A.E. Tolstoluzhinskaya<sup>1,2</sup>, V.S. Popov<sup>1,2</sup>, N.I. Kalinina<sup>2</sup>, Zh.A. Akopyan<sup>1,2</sup>, A.Yu. Efimenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University

119192, Moscow, Lomonosovsky ave., 27-10

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Lomonosovsky ave., 27-1

\*e-mail: basalovana@my.msu.ru

**Keywords:** myofibroblasts, fibroblast activation protein, FAPa, fibrosis, fibrotic focus, microRNA, extracellular vesicles, mesenchymal stromal cells.

## СЕКМЕНТЫ, ОТДАЛЕННЫЕ ОТ ЭПИЦЕНТРА ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

A.P. Bilalova<sup>1\*</sup>, A.V. Timofeeva<sup>1</sup>, I.M. Kabdesh<sup>1</sup>, Ya.O. Muxamedshina<sup>1,2</sup>, Yu.A. Chelyshev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный Университет  
420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

420012, Казань, ул. Бултерова, д. 49

\*e-mail: bilalovaaizilya19@gmail.com

**Ключевые слова:** травма спинного мозга, внеклеточный матрикс, протеогликаны, нейрорегенерация

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к дегенерации двигательных и чувствительных нейронов ниже области повреждения, восстановление которых остается трудноразрешимой проблемой. Среди клеточных и молекулярных изменений в удаленной области, а именно поясничного отдела спинного мозга, где сосредоточен центральный генератор паттерна, особое внимание уделяется компонентам внеклеточного матрикса (ВКМ), в частности, протеогликанам различных классов, которые выступают в роли ингибиторов пластичности и нейрорегенерации. Данных по молекулярной организации ВКМ в отдаленной области недостаточно, что определяет актуальность подобных исследований.

В ходе исследования была установлена экспрессия мРНК генов молекул ВКМ *Acan*, *Vcan*, *Vcan*, *Gpc6*, *Gpc4*, *NG2*, *Tnfr* в вентральных рогах поясничного утолщения (L3-L4) интактного и травмированного на уровне грудного отдела (Th8) спинного мозга на 7 и 60 сутки после повреждения. В качестве групп сравнения был аналогичным образом проанализирован интактный и травмированный спинной мозг в области, приближенной к эпицентру повреждения, на уровне 10 грудного сегмента (Th10).

Уровень экспрессии мРНК гена *Acan* достоверно снижался на 7 (острый период ТСМ) и 60 (хронический период ТСМ) сутки после повреждения в области Th10. Несмотря на значительное расстояние от эпицентра повреждения, на уровне L3-4 также происходило достоверное снижение экспрессии мРНК гена *Acan* на 7 и 60 сутки после ТСМ



при сравнении с интактным спинным мозгом, для которого было отмечено повышение ( $P < 0,05$ ) данного показателя в L3-4 при сравнении с Th10. Достоверное изменение в экспрессии мРНК гена *Grc6* наблюдалось на уровне L3-4: в интактной группе экспрессия данного показателя была выше в 1,6 и 2,2 раз при сравнении с 7 и 60 сутками, соответственно. Достоверное изменение в экспрессии мРНК гена *Tnfr* было обнаружено на 7 и 60 сутки после повреждения в области L3-4, а также на 60 сутки в области Th10 при сравнении с 7 сутками. Наше исследование показало, что экспрессия мРНК гена *Grc4* и *NG2* не претерпевает значительных изменений при моделировании TCM в острый и хронический период в области приближенной и удаленной от эпицентра повреждения. Уровень экспрессии мРНК генов *Vcan*, *Vcan* на 60 сутки после повреждения в области Th10 был выше по сравнению с областью L3-4, также было обнаружено достоверное снижение данного показателя в интактном спинном мозге и на 7 сутки после TCM при сравнении Th10 и L3-4 для *Vcan*.

Эти результаты расширяют представление о молекулярных и клеточных механизмах патологических изменений в отдаленных от эпицентра TCM сегментах для поиска и обоснования перспективных терапевтических мишеней. Кроме того, полученные данные дают обоснование терапевтической эффективности воздействий не только непосредственно на первичную область повреждения, но и на отдаленные отделы спинного мозга. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-25-00002.

### SEGMENTS DISTANT FROM THE EPICENTER OF TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY ARE A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET

A.R. Bilalova<sup>1\*</sup>, A.V. Timofeeva<sup>1</sup>, I.M. Kabdesh<sup>1</sup>, Y.O. Mukhamedshina<sup>1,2</sup>, Y.A. Chelyshev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kazan Federal University  
420008, Kazan, st. Kremlin, 18

<sup>2</sup> Kazan State Medical University  
420012, Kazan, st. Butlerova, 49

\* e-mail: bilalovaaizilya19@gmail.com

**Keywords:** spinal cord injury, extracellular matrix, proteoglycans, neuroregeneration

### ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

М.Е. Богомякова<sup>1,2,3\*</sup>, Е.К. Секретова<sup>1,3</sup>, К.С. Ануфриева<sup>1,2</sup>, П.О. Хабарова<sup>3</sup>, А.Н. Казакова<sup>1</sup>, П.А. Бобровский<sup>1,2</sup>, Т.В. Григорьева<sup>4</sup>, А.Н. Богомазова<sup>1,2</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФНКЦ физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина ФМБА России  
119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

<sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России  
119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

<sup>3</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова  
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

<sup>4</sup> Казанский федеральный университет  
420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, корп. 1

\* e-mail: margbog@rcpcrm.ru

**Ключевые слова:** аутологичные ИПСК, дифференцировка, HLA-I, бета-2-микроглобулин, иммуногенность, иммунотолерантность, NK-клетки.

Более 20 клеточных продуктов, дифференцированных из аутологичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), проходят стадию клинических исследований в разных странах. Долгое время считалось, что такие клеточные продукты будут обладать иммунотолерантностью, то есть, не будут вызывать иммунный ответ при трансплантации. Тем не менее некоторые исследования указывают на возможность распознавания производных ИПСК аутологичными Т-клетками [1,2], что вызывает опасения в отношении безопасности их применения. Данное исследование посвящено изучению иммунного ответа на дифференцированные производные ИПСК. В работе была использована изогенная клеточная модель, состоящая из фибробластов кожи, из которых путем репрограммирования были получены ИПСК, и фибробластоподобных клеток, полученных из ИПСК (iPS-fibro).

В отличие от других авторов [1,2], мы показали, что клетки, дифференцированные из ИПСК, не вызывают существенной активации аутологичных Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*. Неожиданно мы обнаружили, что дифференцированные производные ИПСК чувствительны к цитотоксическим свойствам NK-клеток, независимо от наличия или отсутствия молекул HLA I класса, основных ингибирующих лигандов NK-клеточных рецепторов. С помощью транскриптомного анализа мы показали, что по сравнению с исходными фибробластами в iPS-fibro одновременно наблюдается значительное снижение экспрессии молекул HLA-I и повышение экспрессии лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D. Таким образом, причиной повышенной чувствительности дифференцированных производных ИПСК к действию NK-клеток является дисбаланс NK-клеточных лигандов. Недостаток ингибирующих сигналов может быть компенсирован в ходе длительного культивирования и пассирования iPS-fibro, однако этого недостаточно для снижения NK-клеточного ответа. Далее мы показали, что баланс NK-клеточных лигандов в дифференцированных производных ИПСК может быть возвращен в равновесное состояние за счет предварительной обработки клеточных культур IFN $\gamma$ . Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: проекты #20-315-90041 и #19-29-04113-мк, а также гранта 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования.

#### Литература

1. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212–215.
2. Zhao T, Zhang ZN, Westenskow PD et al. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):353–359.

## IMMUNOGENIC PROPERTIES OF CELLS DIFFERENTIATED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

M.E. Bogomiakova<sup>1,2\*</sup>, E.K. Sekretova<sup>1,2</sup>, K.S. Anufrieva<sup>1</sup>, P.O. Khabarova<sup>2</sup>, A.N. Kazakova<sup>1</sup>, P.A. Bobrovsky<sup>1</sup>, T.V. Grigoryeva<sup>3</sup>, A.N. Bogomazova<sup>1</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1

<sup>3</sup> Kazan Federal University

420008, Kazan, Kremlyovskaya street, 18

\*e-mail: margbog@rcpcm.ru

**Keywords:** autologous iPSCs, differentiation, HLA-I, beta-2-microglobulin, immunogenicity, immune tolerance, NK-cells.

## АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ЖИРОВЫХ КЛЕТОК

C.C. Бойченко<sup>1</sup>, M.A. Юнин<sup>1</sup>, A.D. Егоров<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

354340, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1

\*e-mail: egorov.ad@talantiuspeh.ru

**Ключевые слова:** ожирение, адипоциты, транскрипционные факторы, аденоассоциированные вирусные векторы, FOX P4, PRDM16.

Ожирение диагностируется более чем у полумиллиарда людей и, являясь предвестником сахарного диабета 2-го типа, напрямую влияет на преждевременную смертность в этой группе. Белые адипоциты запасают избыток энергии в форме триглицеридов, тогда как бурые адипоциты отличает высокая катаболическая активность, способность рассеивать энергию в виде тепла. Обнаружение «бежевых» адипоцитов [1], имеющих общее происхождение с белыми, но в которых, как и в бурых, происходит интенсивный липолиз и термогенез открыло возможность для разработки новых подходов к терапии ожирения.

Хорошо описаны транскрипционные регуляторы дифференцировки бурых адипоцитов: к ним относятся PGC1 $\alpha$  (коактиватор основного фактора транскрипции адипогенеза PPAR $\gamma$ ), N-метилтрансфераза лизинон гистонов PRDM16 и недавно охарактеризованный фактор FoxP4 [2].

Нами были созданы генетические конструкции, кодирующие PRDM16 и FoxP4. Для трансдукции адипоцитов были протестированы аденоассоциированные вирусные векторы разных серотипов. Показано, что наибольший тропизм к преадипоцитам мыши 3T3-L1 проявляют 8 и 9 серотипы AAV. Также показано, что индукция экспрессии PRDM16 в клетках 3T3-L1 вызывает экспрессию термогена (UCP1) — основного маркера бурых адипоцитов. С использованием масс-спектрометрии было обнаружено, что трансдукция дифференцированных клеток 3T3-L1 аденоассоциированным вирусом 8-го серотипа, кодирующим ген PRDM16, приводит к значительному снижению (более чем в 10 раз) содержания мононенасыщенных жирных кислот (C14:1, C16:1, C18:1). При трансдукции аденоассоциированным вирусом с FOX P4 также происходит снижение уровня мононенасыщенных

жирных кислот. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-14-20046).

### Литература

1. Wu J, Boström P, Sparks LM et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
2. Perie L, Verma N, Mueller E. The forkhead box transcription factor FoxP4 regulates thermogenic programs in adipocytes. *J Lipid Res*. 2021;62:100102. doi: 10.1016/j.jlir.2021.100102.

## АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ АДИПОЦИТНОЙ РЕПРОГРАММИРОВАННОЙ

S.S. Boychenko<sup>1</sup>, M.A. Yunin<sup>1</sup>, A.D. Egorov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Sirius University of Science and Technology

354340, Sirius, Olympic ave. 1

\*e-mail: egorov.ad@talantiuspeh.ru

**Keywords:** obesity, adipocytes, transcription factors, adenoassociated viral vectors, FOX P4, PRDM16.

## TIL ТЕРАПИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ГЛИОМЫ

A.C. Бугакова<sup>1,2\*</sup>, M.C. Мызина<sup>1,2\*</sup>, Г.Ю. Юсубалиева<sup>1,2,3</sup>, В.П. Баклаушев<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов ФМБА России

115682, Москва, Ореховый бульвар, 29

<sup>2</sup> ФЦМН ФМБА России

117513, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 10

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им.

В.А. Энгельгардта Российской академии наук

119991, Москва

\*e-mail: m.myzina77@mail.ru

**Ключевые слова:** глиобластома, TIL терапия.

Современным стандартом терапии глиобластомы является максимально безопасная резекция опухоли с последующей радио- и химиотерапией. Процент рецидива после терапии составляет около 80% [1]. Основные причины: высокая гетерогенность опухоли, локализация и иммуносупрессивное микроокружение. Альтернативным методом в терапии солидных опухолей является TIL терапия [2].

Материалы и методы: клетки глиобластомы GL261 были предоставлены доктором А. Степаненко (ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России), эксперименты выполнены на C57BL/6 (Модульный SPF-виварий, ИМБ). Моделировали ортотопическую глиобластому на мышах методом стереотаксического введения клеток глиомы. Инвазию глиомы детектировали с помощью MPT на томографе ClinScan 7T (ЦКП «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии», РНИМУ). Через 10 дней мышей под глубоким наркозом декапитировали, выделяли полушарие с глиомой. Для получения TILs ткань глиомы суспендировали и высаживали на пластик в среде IMDM, 10% FBS, PenStrep по протоколу в модификации Юсубалиева и др. [3]. Часть клеток была использована для определения иммунотипа TILs методом проточной цитометрии (MACS Quant, Германия). Через 2–3 дня к вышедшим в среду из ткани лимфоцитам добавляли экзогенные цитокины и активаторы экспансии. Получение TILs по нашему

протоколу занимает 4 недели. В динамике культивирования мониторили состав субпопуляций.

Результаты: Оценку противоопухолевой токсичности полученных TILs проводили на 2D культурах GL261 в режиме реального времени (iCELLigence, Швейцария). Минимальным эффективным соотношением эффекторных клеток (TILs) к целевым (GL261) было 10:1.

Подтверждение активации цитотоксичности в отношении глиомных клеток дополнили в эксперименте на сфероидов [4]. С помощью конфокальной микроскопии (Nikon A1R MP+, Япония) в режиме реального времени оценивали целостность сфероидов GL261-mScarlet после добавления к ним TILs, меченных трейсером Dye 670 (Thermo Fisher, США). Цитотоксическая активность TILs была детектирована через 48 часов по сравнению с негативным контролем. Минимальное эффективное соотношение эффектор:мишень составило 25:1.

Таким образом, был отработан протокол получения TIL, показана их терапевтическая активность на модели in vitro. На следующем этапе планируется воспроизведение эксперимента на человеческих ксенографтах in vivo. Работа выполнена в рамках грантов РФФИ № 21-74-20110 и РФФИ № 22-64-00057.

#### Литература

1. Birzu C. Molecular landscape to new treatment perspectives. *Cancers*. 2020;13(1):47.
2. Hong JJ et al. Treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4892–4898.
3. Yusubaliev GM. Tumor lymphocytes. Purification, expanding and cytotoxicity analysis. *Journal of Clinical Practice*. 2020;11(1):49–58.
4. Yuzhakova D.V. Development of a 3D tumor spheroid model. *Соврем технол мед*. 2023;2.

### TIL THERAPY FOR EXPERIMENTAL GLIOMA MODEL

A.S. Bugakova<sup>1,2</sup>, M.S. Myzina<sup>1,2\*</sup>,  
G.M. Yusubaliev<sup>1,2,3</sup>, V.P. Baklaushev<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia  
115682, Moscow

<sup>2</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, FMBA of Russia  
117513, Moscow

<sup>3</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences  
119991, Moscow

\* e-mail: m.myzina77@mail.ru

**Keywords:** glioblastoma, TIL therapy.

### ЭНДОТЕЛИЗАЦИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ IN VITRO В УСЛОВИЯХ ПОТОКА

Е.А. Великанова\*, М.Ю. Ханова, В.Г. Матвеева,  
Е.О. Кривкина, Е.А. Сенокосова, Л.В. Антонова

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний  
650002, Кемерово, Сосновый б-р, 6

\* e-mail: velikanova\_ea@mail.ru

**Ключевые слова:** тканеинженерные сосудистые протезы; эндотелизация; напряжение сдвига.

Эффективной тактикой предупреждения тромбоза сосудистых протезов является их эндотелизация [1, 2]. Цель работы — оценить эффективность формирования эндотелиального слоя на поверхности сосудистого протеза в условиях напряжения сдвига.

Трубчатые протезы из поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) и поли(ε-капролактона) (PCL) изготавливали методом электроспиннинга. Внутреннюю поверхность покрывали фибрином. Протезы заселяли колониеформирующими эндотелиальными клетками (КФЭК), затем подключали в установку пульсирующего потока, доводили напряжение сдвига до 2,85 дин/см<sup>2</sup> и культивировали суммарно в течение 5 суток («динамика»). Для контроля аналогичные протезы культивировали в статических условиях («статика»).

Внутреннюю поверхность протезов исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание; адгезию и жизнеспособность клеток оценивали окраской Hoechst 33342 и этидиум бромидом.

PHBV/PCL-каркасы обладали однородной высокопористой структурой. Фибрин на поверхности образовывал равномерное мелкопористое покрытие. На внутренней поверхности PHBV/PCL/фибрин протезов, в отличие от немодифицированных, обнаружены распластанные, равномерно распределенные КФЭК.

Не было отличий в плотности клеточной популяции и жизнеспособности КФЭК в «статике» и «динамике».

КФЭК в протезах обладали высоким уровнем экспрессии эндотелиальных маркеров. В «динамике» эти показатели были выше, за исключением CD144.

Экспрессия F-актина была достоверно выше в «динамике», как и экспрессия талина.

Таким образом, возможно создание персонализированного биодеградируемого клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра с фибриновым фидерным слоем. Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

#### Литература

1. Ardila DC, Liou JJ, Maestas D et al. Surface modification of electrospun scaffolds for endothelialization of tissue-engineered vascular grafts using human cord blood-derived endothelial cells. *J Clin Med*. 2019;8(2):185.
2. Braghirolli DI, Helfer VE, Chagastelles PC et al. Electrospun scaffolds functionalized with heparin and vascular endothelial growth factor increase the proliferation of endothelial progenitor cells. *Biomed Mater*. 2017;12(2):025003.

## ENDOTHELIZATION OF VASCULAR PROSTHESES IN VITRO UNDER FLOW CONDITIONS

E.A. Velikanova\*, M.Yu. Khanova, V.G. Matveeva, E.O. Krivkina, E.A. Senokosova, L.V. Antonova

*Federal State Budgetary Institution "Research institute for complex issues of cardiovascular diseases"*

650002, Kemerovo, 6 Sosnoviy blv.

\*e-mail: velikanova\_ea@mail.ru

**Keywords:** tissue-engineered vascular prostheses; endothelization; shear stress.

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПРАЙМИРОВАННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МУТАЦИИ F508del ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

O.V. Володина<sup>1</sup>, A.G. Демченко<sup>1</sup>, M.C. Пилкин<sup>1</sup>, E.B. Куршакова<sup>1</sup>, E.B. Кондратьева<sup>1</sup>, A.B. Лавров<sup>1</sup>, S.A. Смирнихина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н.П. Бочкова»

115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

\*e-mail: volodold@gmail.com

**Ключевые слова:** геномное редактирование, праймированное редактирование, муковисцидоз, генная терапия.

Праймированное редактирование (prime editing, PE) — молекулярная платформа для редактирования генома, состоящая из нуклеазы Cas9, обратной транскриптазы и гидовой РНК для праймированного редактирования (pegRNA). Поскольку для редактирования не требуется внесение двухцепочечного разрыва в молекулу ДНК, PE потенциально безопаснее других молекулярных редакторов, что, наряду с высокой эффективностью и широким спектром возможных изменений генома, позволяет использовать PE для разработки генной терапии пациентов с мутацией F508del в гене *CFTR*. Целью работы явился подбор оптимальных вариантов pegRNA для коррекции мутации F508del в гене *CFTR*.

С помощью онлайн-ресурсов PE-Designer (CRISPR RGEN Tools) и pegLIT был сделан дизайн 24 pegRNA, из которых 15 для модификации праймированного редактора PEmax и девять — для PE2-NG. Плазмиды с pegRNA были собраны методом рестрикции и лигирования на основе плазмиды pU6-pegRNA-GG-acceptor. Эксперименты были поставлены на базальных клетках легкого, полученных из ЧИПСК двух пациентов с муковисцидозом (гомозиготы по F508del в гене *CFTR*), с доставкой плазмид для редактирования с помощью электропорации (Neon, Thermo Fisher Scientific). Оценка эффективности редактирования была проведена через 72 часа с помощью глубокого таргетного секвенирования. Функциональный анализ CFTR-канала в легочных органоидах, образованных из базальных клеток легкого, проводили методом форсколин-индуцированного набухания (FIS). Изображения анализировали в программном обеспечении ilastik и CellProfiler.

В результате экспериментов наибольшую эффективность показали pegRNA1 и pegRNA5 в сочетании с PEmax, а также pegRNA17, pegRNA19, pegRNA20,

pegRNA21 и pegRNA22 в сочетании с PE2-NG: эффективность редактирования составила от 15% до 49%. Для наиболее эффективных комбинаций праймированного редактирования (pegRNA17 и pegRNA22 в сочетании с PE2-NG) был проведен функциональный анализ проводимости канала CFTR после редактирования. Для этого из базальных клеток легкого после редактирования были получены легочные органоиды, в которых проведено форсколин-индуцированное набухание. Органоиды после редактирования pegRNA17 и pegRNA22 набухали в среднем в 1,3 раза ( $p=0,0332$ ) и 1,4 раза ( $p=0,0008$ ) относительно исходного значения, соответственно. При этом органоиды, полученные из базальных клеток легкого с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR* без редактирования, не набухали в ответ на форсколин относительно исходного значения ( $p=0,7337$ ).

Таким образом, в результате работы были выявлены потенциальные варианты праймированного редактирования, позволяющие корректировать мутацию F508del в гене *CFTR* с высокой эффективностью и продемонстрировано частичное восстановление проводимости канала CFTR при функциональном анализе.

## SELECTION OF OPTIMAL PRIME EDITING OPTIONS FOR CORRECTION OF F508del MUTATION FOR THE TREATMENT OF CYSTIC FIBROSIS

O.V. Volodina<sup>1</sup>, A.G. Demchenko<sup>1</sup>, M.S. Pilkin<sup>1</sup>, E.V. Kurshakova<sup>1</sup>, E.V. Kondrateva<sup>1</sup>, A.V. Lavrov<sup>1</sup>, S.A. Smirnikhina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics

115522, Moscow, Moskvorochye, 1

\*e-mail: volodold@gmail.com

**Keywords:** gene editing, prime editing, cystic fibrosis, gene therapy.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ sgРНК ДЛЯ Cas9: ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В НЕАДРЕСУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ sgРНК НА СВОЙСТВА СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

П.Е. Воробьев\*, И.П. Вохтанцев, М.И. Мещанинова, М.Р. Кабилов, Д.О. Жарков, М.А. Воробьева

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

\*e-mail: vorobyev@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** молекулярная селекция in vitro, sgRNA, направляющая РНК, SpCas9, CRISPR/Cas, геномное редактирование.

Ключевым компонентом широко используемых инструментов геномного редактирования, созданных на основе CRISPR/Cas, является нуклеопротеиновый комплекс, состоящий из нуклеазы Cas9 и единой направляющей РНК (sgРНК) [1]. В структуре комплекса множественные контакты неадресуемого фрагмента sgРНК с белком Cas9 обеспечивают корректную конформацию и активность комплекса в целом [2]. Для повышения эффективности и точности геномного

редактирования с помощью рационального дизайна получают новые варианты нуклеазы Cas9 и sgPНК. Известно, что нуклеотидные замены, вставки и делеции в неадресующей области sgPНК влияют на селективность и эффективность расщепления ДНК-мишени комплексом Cas9/sgPНК [2]. В нашей работе впервые предложено использовать для получения новых вариантов sgPНК молекулярную селекцию *in vitro*. Данный метод дает возможность отобрать из комбинаторной библиотеки sgPНК с константной адресующей областью варианты с нуклеотидными заменами в неадресующей области. Новые варианты sgPНК могут обеспечить системе улучшенные характеристики, такие как повышенная селективность по отношению к корректным мишеням, повышенная скорость диссоциации продуктов расщепления из комплекса с ферментом и многооборотность расщепления ДНК.

Нами предложен новый подход к *in vitro* селекции из комбинаторной библиотеки sgPНК, разработана конструкция библиотеки и схемы селекции. Выполнены эксперименты по селекции sgPНК для SpCas9 и высокопроизводительному секвенированию конечного и промежуточных пулов. На основании частотного анализа секвенированных пулов определены последовательности — лидеры отбора. Выполнен химический синтез новых вариантов sgPНК, содержащих нуклеотидные замены в неадресующей области. Показано, что новые варианты направляющих PНК обладают отличиями от исходной sgPНК свойствами. В частности, нуклеотидные замены в неадресующей области sgPНК приводят к изменению термодинамической константы диссоциации комплекса ДНК-мишени с нуклеопротеидом Cas9/sgPНК и наблюдаемой кинетической константы гидролиза ДНК-мишени комплексом Cas9/sgPНК. Данные изменения по-разному проявляются в отношении корректной и некорректных (содержащих различные однонуклеотидные замены в PAM-дистальной области протоспейсера) ДНК-мишеней, приводя к повышению селективности действия системы в отношении корректной мишени. Исследование было поддержано грантом РФФИ № 22-24-00930.

#### Литература

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. doi:10.1126/science.1225829.
2. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.

### MOLECULAR SELECTION OF SGRNA FOR CAS9: NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN INVARIABLE REGION OF SGRNA AFFECT THE GENOME EDITING

P.E. Vorobjev\*, I.P. Vokhtantsev, M.I. Meschaninova, M.R. Kabilov, D.O. Zharkov, M.A. Vorobyeva

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Avenue

\*e-mail: vorobyev@niboch.nsc.ru

**Keywords:** SELEX, sgRNA, guide RNA, SpCas9, CRISPR/Cas, genome editing.

### ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В НАУКАХ О ЖИЗНИ

Ю.В. Вяткин<sup>1\*</sup>, Д.В. Антоненц<sup>1</sup>,  
Д.Н. Штокало<sup>1,2</sup>, В.Е. Раменский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт перспективных исследований проблем искусственного интеллекта и интеллектуальных систем МГУ имени М.В. Ломоносова  
119234, Москва, Ломоносовский просп., 27, корп. 1

<sup>2</sup> Институт систем информатики им. А.П. Ершова СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 6

\*e-mail: Y.Vyatkin@iai.msu.ru

**Ключевые слова:** искусственный интеллект, нейронные сети, биоинформатика, наука о данных, машинное обучение, биология, химия, медицина.

Применение ИИ в науках о жизни насчитывает давнюю историю. Медицинские экспертные системы появились в 60-х годах XX века. Однако все поменялось с приходом технологий машинного обучения в конце первой декады XXI века. С тех пор ИИ в науках о жизни пережил уже три волны бурного развития.

Первая волна пришла на начало 2010-х, когда сверточные нейронные сети, развитие статистических наук и соответствующие вычислительные мощности позволили обрабатывать гигантские объемы биологических, химических и медицинских данных. Символом этой эпохи стал массовый скрининг потенциальных лекарственных соединений и в целом разработка препаратов *in silico* [1].

Вторая волна связана с успехами в технологиях машинного зрения, которые позволили работать не только с табличными данными, но и автоматизировать и масштабировать работу с микроскопами [2].

Сейчас идет третья волна развития ИИ, которая стала возможной благодаря ряду факторов:

- росту производительности графических вычислительных процессоров,
- развитию архитектур нейронных сетей (рекуррентные нейронные сети, автоэнкодеры, трансформеры и другие),
- развитию больших языковых моделей и
- появлению генеративно-состязательных архитектур.

Ключевым прорывом стало появление AlphaFold 2 [3] — решения задачи о предсказании пространственной структуры белка (хотя решения не окончательного). С тех пор обработка данных в науках о жизни стала практически ежемесячно получать новые решения классических задач:

- предсказания структур всех известных нам белков,
- массового скрининга лекарственных соединений и мишеней для них,
- генерации путей синтеза химических соединений и поиск их уникальных свойств,
- генерации последовательностей белковых соединений с заданными свойствами,
- массового извлечения знаний из научных публикаций,
- автоматизированного анализа медицинских изображений,
- и даже поиска уникальных новых антибиотиков [4].

Все эти достижения позволяют предположить, что обработка данных в науках о жизни скоро сможет быть автоматизирована, чтобы обеспечить исследователям возможность получать ответы на задаваемые научные

и практические вопросы без погружения в рутинную работу. Возможно, и постановка таких вопросов также окажется в ведении искусственного интеллекта.

#### Литература

1. Wallach I et al. AtomNet: A deep convolutional neural network for bioactivity prediction in structure-based drug discovery. arXiv. 2015;arXiv:1510.02855v1.
2. Jamal S et al. Predicting neurological Adverse Drug Reactions based on biological, chemical and phenotypic properties of drugs. Sci Rep. 2017;7(1):872. doi:10.1038/s41598-017-00908.
3. Jumper J et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 2021;596:583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
4. de la Fuente-Nunez C. Antibiotic discovery with machine learning. Nat Biotechnol. 2022;40:833–834. doi:10.1038/s41587-022-01327-w.

### ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN LIFE SCIENCES

Y.V. Vyatkin<sup>1\*</sup>, D.V. Antonets<sup>1</sup>,  
D.N. Shtokalo<sup>1,2</sup>, V.E. Ramensky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MSU Institute for Artificial Intelligence, Lomonosov Moscow State University  
119192, Moscow, 27, bld.1, Lomonosovsky Prospekt

<sup>2</sup> A.P. Ershov institute of informatics systems SB RAS  
630090, Novosibirsk, 6 Lavrentyeva ave.

\*e-mail: Y.Vyatkin@iai.msu.ru

**Keywords:** artificial intelligence, neural networks, bioinformatics, data science, machine learning, biology, chemistry, medicine.

### СЕЛЕКТИВНОЕ НАРУШЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В РАЗНЫХ ТИПАХ НЕЙРОНОВ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.А. Грехнёв<sup>1\*</sup>, А. Ошколова<sup>1</sup>, Ю.В. Новикова<sup>1</sup>,  
А.В. Крисанова<sup>1</sup>, А.А. Кручинина<sup>1</sup>,  
Е.А. Воловиков<sup>2</sup>, Л.Д. Беликова<sup>2</sup>, О.С. Лебедева<sup>2,3</sup>,  
Е.В. Казначеева<sup>1</sup>, В.А. Вигонт<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт цитологии РАН  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

<sup>2</sup> ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

<sup>3</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

\*e-mail: dima.grehnyov@yandex.ru

**Ключевые слова:** кальциевая сигнализация, депо-управляемый вход кальция, пациент-специфичные модели, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полиглутаминовые нейродегенеративные заболевания.

Кальциевая сигнализация — один из наиболее универсальных регуляторных механизмов в клетках. Ионы кальция принимают участие в реализации

большинства клеточных процессов. Нарушение кальциевого гомеостаза ассоциировано с развитием разнообразных патологий, включая нейродегенеративные заболевания. Основной фокус наших исследований сосредоточен на изучении aberrантной кальциевой сигнализации при полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваниях. Благодаря использованию пациент-специфичных моделей, полученных путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов и здоровых доноров в разные типы нейронов мы получили возможность исследовать нейрон-специфичные нарушения кальциевой сигнализации у пациентов с полиглутаминовыми нейродегенеративными заболеваниями. Мы сосредоточились на исследовании трех полиглутаминовых заболеваний: болезни Хантингтона (БХ) и спиноцереbellлярных атаксиях 1 и 17 типов (СЦА1 и СЦА17). Используя метод пэтч-кламп и флуоресцентный кальциевый имиджинг, мы выявили увеличение притока кальция через депо- и потенциал-управляемые кальциевые каналы в ГАМК-ергических нейронах больных БХ и СЦА17, для которых характерна массовая гибель нейронов данного типа. Однако мы не наблюдали выраженных нарушений кальциевой сигнализации в ГАМК-ергических нейронах пациентов с СЦА1, для которой не характерна их гибель. Далее мы дифференцировали ИПСК больных БХ и СЦА17 в дофаминергические нейроны, массовая гибель которых нехарактерна для данных заболеваний, и показали отсутствие нарушений в депо-управляемом входе кальция (SOCE). Таким образом, SOCE селективно нарушен в ГАМК-ергических нейронах при БХ и СЦА17, что может лежать в основе их избирательной уязвимости. Выявив патологическое увеличение SOCE в ГАМК-ергических нейронах больных БХ и СЦА17, мы определили ключевые молекулярные детерминанты, лежащие в основе увеличенного SOCE, и предложили ряд малых молекул для коррекции наблюдаемых нарушений кальциевой сигнализации [1–4]. Работа поддержана Грантом РНФ № 22-14-00218.

#### Литература

1. Nekrasov ED et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. Mol Neurodegener. 2016;11:27.
2. Vigont VA et al. STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of Huntington's disease. Front Cell Dev Biol. 2021;9:625231.
3. Grekhnev DA et al. Dithiadiazole derivative 3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-3H-1,2,3,4-dithiadiazole-2-oxide — Novel modulator of store-operated calcium entry. Biochem Biophys Res Commun. 2022;626:38–43.
4. Grekhnev DA et al. The mystery of EVP4593: Perspectives of the quinazoline-derived compound in the treatment of Huntington's disease and other human pathologies. Int J Mol Sci. 2022;23(24):15724.

### SELECTIVE DISTURBANCE OF CALCIUM SIGNALING IN DIFFERENT TYPES OF NEURONS IN PATIENT-SPECIFIC MODELS OF POLYGLUTAMINE NEURODEGENERATIVE DISEASES

D.A. Grekhnev<sup>1\*</sup>, A. Oshkolova<sup>1</sup>, I.V. Novikova<sup>1</sup>, A.V. Krisanova<sup>1</sup>, A.A. Kruchinina<sup>1</sup>, E.A. Volovikov<sup>2</sup>, L.D. Belikova<sup>2</sup>, O.S. Lebedeva<sup>2, 3</sup>, E.V. Kaznacheeva<sup>1</sup>, V.A. Vigont<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences  
194064, St. Petersburg, Tikhoretsky prospect, 4

<sup>2</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency  
119435, Moscow, st. Malaya Pirogovskaya, 1A

<sup>3</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency  
119435, Moscow, st. Malaya Pirogovskaya, 1A

\*e-mail: dima.grekhnyov@yandex.ru

**Keywords:** calcium signaling, store-operated calcium entry, patient-specific models, induced pluripotent stem cells, polyglutamine neurodegenerative diseases.

### РЕЦЕПТОР АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ TGF $\beta$ 1-ИНДУЦИРОВАННОГО МЕЗОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ЭПИКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

K.B. Дергилев<sup>1\*</sup>, З.И. Цоколаева<sup>1</sup>, Ю.Д. Гольцева<sup>1</sup>, И.Б. Белоглазова<sup>1</sup>, Е.В. Парфенова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение НМИЦ Кардиологии им. академика Е.И. Чазова МЗ РФ  
121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

\*e-mail: doctorkote@gmail.com

**Ключевые слова:** эпикард, мезотелиально-мезенхимальный переход, урокиназный рецептор, фиброз.

Фиброз миокарда является ключевым фактором прогрессирования большинства сердечно-сосудистых заболеваний, включая хроническую сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса, и рассматривается как ключевая нерешенная проблема современной медицины. Недавние исследования показывают, что в развитии фиброза в сердце участвуют клетки эпикарда, которые под действием TGF $\beta$ 1 способны вступать в мезотелиально-мезенхимальный переход (ММП) и образовывать фибробласты/миофибробласты, однако механизмы регуляции этого процесса остаются малоизученными.

В рамках данной работы было сделано предположение, что в регуляции профиброзной активности клеток эпикарда участвует рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), который при взаимодействии со специфическими лигандами и белками-посредниками, способен активировать внутриклеточный сигналинг, запускать каскад протеолитических реакций, обеспечивая ремоделирование матрикса.

Мы показали, что воздействие профиброзного фактора TGF $\beta$ 1 сопровождается резким увеличением экспрессии uPAR, а также выраженными морфологическими изменениями клеточной культуры *in vitro*: клетки эпикарда

приобретали веретенообразную форму, утрачивали эпителиальные маркеры (ZO1, E-кадгерин) и приобретали фибробластоподобные характеристики. Подавление экспрессии uPAR в клетках эпикарда с помощью CRISPR/Cas9 технологии сопровождалось повышением их устойчивости к воздействию TGF $\beta$ 1 и блокировало появление признаков активации ММП. Сходные изменения в зоне эпикарда наблюдались у uPAR<sup>-/-</sup> мышей при моделировании острого перикардита *in vivo*, в сравнении с животными дикого типа.

Эти данные позволяют рассматривать uPAR в качестве перспективной мишени для разработки средств таргетного воздействия, направленных на предотвращение профиброзной трансформации клеток эпикардиального мезотелия. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 23-15-00540.

### THE UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECEPTOR IS INVOLVED IN THE REGULATION OF TGF $\beta$ 1-INDUCED MESOTHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN EPICARDIAL CELLS

K.V. Dergilev<sup>1\*</sup>, Z.I. Tsokolaeva<sup>1</sup>, Y.D. Goltseva<sup>1</sup>, I.B. Beloglazova<sup>1</sup>, Ye.V. Parfyonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution NMRC of cardiology named after academician E.I. CHAZOV of the Ministry of Health of the Russian Federation  
121552, Moscow, 15a Akademika Chazova str.

\*e-mail: doctorkote@gmail.com

**Keywords:** epicardium, mesothelial-mesenchymal transition, urokinase receptor, fibrosis.

### ПРОФИБРОТИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ ИЗМЕНЯЮТ СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ СПОСОБНОСТЬ ВЛИЯТЬ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ

У.Д. Дьячкова<sup>1, 2\*</sup>, М.А. Виговский<sup>1, 2</sup>, Н.А. Басалова<sup>2</sup>, А.А. Гарджук<sup>1</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1, 2</sup>, О.А. Григорьева<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
119991, Москва, Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

<sup>2</sup> Институт регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
119192, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10.

\*e-mail: Dyachkovauliana@gmail.com

**Ключевые слова:** макрофаги, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, внеклеточный матрикс, внеклеточные везикулы, поляризация макрофагов.

Фиброз часто описывается как реакция восстановления после повреждения, вышедшая из-под контроля [1]. Ключевыми регуляторами фиброза считаются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), основные эффекты которых обусловлены секрецией растворимых факторов и регуляторных молекул, входящих в состав внеклеточных везикул (ВВ). Важную роль в развитии фиброза играет хроническое воспаление, обусловленное, в первую очередь, действием макрофагов [2]. Ранее мы показали, что ВВ МСК регулируют

поляризацию макрофагов, способствуя противовоспалительному M2-типу и подавляя провоспалительный M1-тип. Фибротические изменения, развивающиеся при хроническом воспалении, влияют на состав секрета МСК, однако эффекты секрета МСК на макрофаги в измененном микроокружении остаются малоизученными. Целью нашей работы стало изучение влияния профибротических условий на способность МСК регулировать поляризацию макрофагов.

Для этого мы выделяли моноциты из периферической крови человека и стимулировали их дифференцировку в макрофаги с помощью GM-CSF или M-CSF, а затем запускали поляризацию действием LPS в комбинации с IFN $\gamma$  для поляризации в M1, IL-4 — в M2. К поляризованным макрофагам добавляли ВВ МСК жировой ткани человека, культивированных в стандартных или в профибротических условиях. Последние создавали путем культивирования МСК на децеллюляризованном внеклеточном матриксе фибробластов кожи человека с добавлением 5 нг/мл TGF $\beta$ -1. Затем анализировали уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных факторов и их секрецию макрофагами после действия ВВ МСК.

Мы показали, что действие ВВ МСК, культивированных в профибротических условиях, в сравнении с добавлением контрольных ВВ, увеличивает экспрессию генов провоспалительных факторов IL-12p35, TNF $\alpha$  и IL-6 M2-в макрофагах, а также ведет к росту уровня секреторируемого IL-6. При этом снижается экспрессия гена противовоспалительного цитокина IL-10, хотя концентрация секреторируемого белка незначительно увеличивается, что может быть связано с различным временем измерения после воздействия ВВ МСК на макрофаги.

Таким образом, добавление ВВ МСК, культивированных в профибротических условиях, к поляризованным макрофагам приводит к росту секреции провоспалительных цитокинов M2-макрофагами и смещению их фенотипа в сторону M1-типа. Так профибротическое микроокружение способно влиять на функцию МСК, приводя к снижению их способности подавлять воспаление за счет регуляции поляризации макрофагов. Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-29-04172.

#### Литература

1. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(3):524–529.
2. Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix biology*. 2018;68–69:81–93.

### PROFIBROTIC CONDITIONS CHANGE EV MSC COMPOSITION AND THEIR ABILITY TO EFFECT MACROPHAGES POLARISATION

U.D. Dyachkova<sup>1,2\*</sup>, M.A. Vigovskii<sup>1,2</sup>, N.A. Basalova<sup>2</sup>, A.A. Gardzhuk<sup>1</sup>, A.Yu. Efimenko<sup>1,2</sup>, O.A. Grigorieva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Lomonosovskii av. 27/1

<sup>2</sup> Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University

119992, Moscow, Lomonosovskii av. 27/10

\*e-mail: Dyachkovauliana@gmail.com

**Keywords:** macrophages, multipotent mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, extracellular vesicles, macrophage polarisation.

### ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ДОНОРОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ХОЛОДОВОМУ ОСАХАРИВАНИЮ ПУТЕМ НОКАУТА ГЕНА ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ

A.A. Егорова<sup>1,2\*</sup>, Т.Е. Зыкова<sup>2</sup>, И.А. Сабоев<sup>1</sup>, Н.Е. Костина<sup>1</sup>, К.А. Колошина<sup>1</sup>, И. Хоффи<sup>3</sup>, Ш. Хикель<sup>3</sup>, К. Хертиг<sup>3</sup>, С. Чамас<sup>3</sup>, Е.А. Филипенко<sup>1</sup>, Й. Кумлен<sup>3</sup>, С.В. Герасимова<sup>1</sup>, А.В. Кочетов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

630090, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> IPK

06466, Gatersleben, Germany

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

**Ключевые слова:** геномное редактирование, CRISPR/Cas9, клубни картофеля, редуцирующие сахара.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из самых важных сельскохозяйственных культур. Так как в умеренно климатических зонах урожаи картофеля собирают раз в году, осенью, то для круглогодичного использования клубни картофеля традиционно хранят при низких температурах (4–6 °C). Холод предотвращает прорастание и усыхание клубней, а также процесс гниения. Однако одним из недостатков хранения клубней картофеля на холоде является накопление редуцирующих сахаров так называемое холодное осахаривание. При этом крахмал распадается на простые редуцирующие (восстанавливающие) сахара: глюкозу и фруктозу. При термической обработке (например, при приготовлении картофельных чипсов) эти сахара реагируют со свободными аминокислотами, что приводит к появлению темноокрашенных горьких продуктов, что уменьшает потребительскую ценность картофеля. Поэтому важно получать новые сорта с устойчивостью к холодному осахариванию.

Для получения новых доноров признака устойчивости к холодному осахариванию для селекции картофеля мы предложили и осуществили стратегию, которая заключается в выключении гена вакуолярной инвертазы *Pain-1* у элитного сорта. Вакуолярная инвертаза расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу и вносит большой вклад в накопление редуцирующих сахаров.

Мы проанализировали накопление сахаров и экспрессию генов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*) и ее ингибитора (*Inh2*) в ответ на холод у трех элитных сортов: Никулинский, Невский, Симфония — и выбрали сорт Симфония в качестве генотипа для модификации.

Для направленного нокаута гена мы использовали систему РНК-направленной эндонуклеазы Cas9. Мы создали конструкции, содержащие гены нРНК и нуклеазы *cas9*. Активность конструкций была оценена на протопластах картофеля, а для получения мутантных растений был использован метод агробактериальной трансформации листовых эксплантов. Было получено 10 мутантных линий, 8 из которых содержали мутации во всех четырех аллелях гена вакуолярной инвертазы. В трех линиях была проведена оценка холодного осахаривания, две из них показали значимое снижение содержания глюкозы в клубнях при хранении на холоде. Данные линии планируется использовать в качестве доноров для селекции. Исследование поддержано Курчатовским геномным центром ИЦиГ (075-15-2019-1662).



### GENERATION OF NEW POTATO BREEDING DONORS WITH RESISTANCE TO COLD-INDUCED SWEETENING BY KNOCKING OUT THE VACUOLAR INVERTASE GENE

A.A. Egorova<sup>1,2\*</sup>, T.E. Zykova<sup>1,2</sup>, N.E. Kostina<sup>1</sup>, I.A. Saboiev<sup>1</sup>, K.A. Koloshina<sup>1</sup>, I. Hoffie<sup>3</sup>, C. Hertig<sup>3</sup>, S. Hiekel<sup>3</sup>, S. Chamas<sup>3</sup>, E.A. Filipenko<sup>1</sup>, J. Kumlehn<sup>3</sup>, S.V. Gerasimova<sup>1</sup>, A.V. Kochetov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ICG SB RAS  
630090, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> NSU  
630090, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> IPK  
06466, Gatersleben, Germany

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

**Keywords:** gene editing, CRISPR/Cas9, potato tubers, reducing sugars.

### МОДУЛЯЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА FoxP3 ПЕРЕКЛЮЧАЮЩИМИ СПЛАЙСИНГ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ КАК ПОДХОД К УВЕЛИЧЕНИЮ СУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Д.Д. Жданов<sup>1</sup>, В.Г. Блинова<sup>1</sup>, Ю.А. Гладилина<sup>1</sup>, А.А. Абрамова<sup>1,2</sup>, Д.Д. Елисеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научный центр неврологии»  
125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

\*e-mail: zhdanovdd@mail.ru

**Ключевые слова:** регуляторные Т-клетки, альтернативный сплайсинг, FoxP3, супрессорная активность, переключающие сплайсинг олигонуклеотиды, аутоиммунные заболевания.

Контроль иммунного ответа на аутоантигены осуществляют регуляторные Т-клетки (Трег). Понижение количества и/или нарушение супрессорной функции Трег наблюдается у пациентов с некоторыми аутоиммунными заболеваниями (рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, синдром Шегрена, псориаз и др.). Причины, по которым развиваются данные отклонения Трег звена иммунных клеток не изучены в полной мере. Транскрипционный фактор FoxP3 является «мастерным белком», регулирующим дифференцировку, созревание, а также интенсивность пролиферации и супрессорной активности Трег [1]. Описано четыре изоформы белка FoxP3, образующихся в результате альтернативного сплайсинга его пре-мРНК: полноразмерный вариант, варианты с делецией каждого из экзонов 3 или 8, а также с делецией обоих экзонов. Роль сплайс-вариантов FoxP3 в регуляции функций Трег не изучена в полной мере [2].

В Трег периферической крови пациентов с РС выявлено изменение экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в сторону синтеза варианта с делецией экзона 3, по сравнению с Трег здоровых доноров, у которых превалирует полноразмерный вариант. Трег таких пациентов обладали пониженной супрессорной активностью. Из крови пациентов выделены Трег и трансфицированы переключающими сплайсинг олигонуклеотидами для

индукции синтеза полноразмерного сплайс-варианта FoxP3. Данные специфичные олигонуклеотиды комплементарны регуляторным последовательностям на цепи пре-мРНК FoxP3 (последовательностям, являющимися сайтами взаимодействия с регулирующими сплайсинг SR-белками). Таким образом осуществлена модуляция включения экзона 3 в мРНК FoxP3 и синтез полноразмерного сплайс-варианта этого белка. Полученные клетки показали в три раза большую супрессорную активность, т.е. способность ингибировать аутологичные таргетные эффекторные Т-лимфоциты. Пролиферативная активность, таких клеток была выше в 2 раза. Клетки синтезировали специфичные для Трег цитокины, гранзимы и супрессорные рецепторы на мембране более интенсивно, по сравнению с контрольными клетками.

Стратегия увеличения супрессорной активности Трег при помощи переключающих сплайсинг олигонуклеотидов применена к аутологичным Трег больных РС. Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00326, <https://rscf.ru/project/23-24-00326/>.

#### Литература

1. Lifshitz GV, Zhdanov DD, Lokhonina AV et al. Ex vivo expanded regulatory T cells CD4+CD25+FoxP3+CD127Low develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 2016;49:388–396.
2. Blinova VG, Novachly NS, Gippius SN et al. Phenotypical and functional characteristics of human regulatory T cells during ex vivo maturation from CD4+ T Lymphocytes. *Appl Sci*. 2021;11:5776.

### MODULATION OF ALTERNATIVE SPLICING OF FoxP3 BY SWITCHING SPLICING OLIGONUCLEOTIDES AS AN APPROACH TO INCREASING THE SUPPRESSOR ACTIVITY OF REGULATORY T CELLS FOR REGENERATIVE THERAPY OF MULTIPLE SCLEROSIS

D.D. Zhdanov<sup>1</sup>, V.G. Blinova<sup>1</sup>, Yu.A. Gladilina<sup>1</sup>, A.A. Abramova<sup>1,2</sup>, D.D. Eliseeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)  
119121, Moscow, Pogodinskaya, 10/8

<sup>2</sup> Research Center of Neurology  
125367, Moscow, Volokolamskoe shosse, 80

\*e-mail: zhdanovdd@mail.ru

**Keywords:** regulatory T cells, alternative splicing, FoxP3, suppressor activity, splicing-switching oligonucleotides, autoimmune diseases.

### БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ СЕРДЦА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ S805L В ГЕНЕ SCN5A

А.К. Зайцева<sup>1\*</sup>, Б.С. Жоров<sup>1</sup>, А.А. Костарева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России  
197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

<sup>2</sup> Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet  
171 77, Stockholm, Sweden

\*e-mail: zaytseva.anastasia.zak@gmail.com

**Ключевые слова:** Nav1.5, patch-clamp, SCN5A, аритмии, натриевые каналопатии.

Основная физиологическая роль потенциал-зависимых натриевых каналов сердца ( $Na_v1.5$ ) — это обеспечение инициации и распространения потенциала действия в кардиомиоцитах за счёт быстрого входа ионов натрия в клетку. Генетические варианты в гене *SCN5A*, кодирующем  $Na_v1.5$ , ассоциированы с развитием наследственных аритмогенных синдромов и кардиомиопатий. Миссенс-варианты в *SCN5A* могут приводить к уменьшению активности канала или к увеличению его активности. Также существуют замены, которые приводят к развитию смешанного фенотипа, сочетающего признаки дисфункции и гиперфункции  $Na_v1.5$ .

Нами был идентифицирован вариант S805L в гене *SCN5A* у пациента ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» с нарушением сердечной проводимости и аритмией. Согласно базе данных ClinVar данный вариант ранее был обнаружен у пациента с синдромом Бругада и в соответствии с критериями классификации AGMC относится к вариантам с неизвестной клинической значимостью.

С помощью методики сайт-специфического мутагенеза (ПЦР-амплификация с использованием перекрывающихся праймеров) была сгенерирована мутантная конструкция S805L на базе вектора pCDNA3.1-*SCN5A*. В качестве модельного объекта использовалась линия HEK293-T, трансфицированная pCDNA3.1-*SCN5A*-WT или pCDNA3.1-*SCN5A*-S805L. Регистрация биофизических характеристик проводилась с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении от целой клетки (whole-cell configuration).

Для объяснения детального биофизического механизма влияния мутации S805L на развитие аритмогенного фенотипа, мы исследовали различные электрофизиологические характеристики каналов  $Na_v1.5$ -WT и  $Na_v1.5$ -S805L. Мы показали статистически значимое снижение плотности натриевого тока в 4,5 раза. S805L приводил к достоверному сдвигу кривой стационарной активации на 7 мВ в сторону деполяризации. Таким образом, снижение плотности тока и замедлению активации свидетельствуют об уменьшении активности  $Na_v1.5$ . Однако мутация S805L также приводила к положительному сдвигу кривой стационарной инактивации на 9 мВ, что свидетельствует об усилении активности  $Na_v1.5$ . Таким образом, с точки зрения биофизических характеристик при S805L наблюдается смешанная картина, сочетающая свойства фенотипа уменьшения активности и увеличения активности  $Na_v1.5$ .

В дальнейшем планируется верификация полученных биофизических данных, на моделях кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациента с вариантом S805L и здоровых доноров, а также на модели кардиомиоцитов *D. rerio*, несущих аналогичную замену.

Таким образом, зарегистрированные изменения плотности натриевого тока и параметров стационарной активации и инактивации могут лежать в основе нарушения проводимости сердца и развития аритмии у пациента с генетическим вариантом S805L. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00186.

## BIOPHYSICAL MECHANISMS OF CONDUCTION DISEASE, ASSOCIATED WITH GENETIC VARIANT S805L IN SCN5A GENE

A.K. Zaytseva<sup>1\*</sup>, B.S. Zhorov<sup>2</sup>, A.A. Kostareva

<sup>1</sup> *Almazov National Medical Research Centre*  
197341, St. Petersburg, Akkuratova street, 2

<sup>2</sup> *Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet*  
171 77, Stockholm, Sweden

\* e-mail: zaytseva.anastasia.zak@gmail.com

**Keywords:** arrhythmia,  $Na_v1.5$ , patch-clamp, *SCN5A*, sodium channelopathies.

## КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ В БОРЬБЕ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

И.С. Захарова<sup>1\*</sup>, А.И. Шевченко<sup>1</sup>, Н.А. Тмоян<sup>2</sup>, Е.А. Елисафенко<sup>1</sup>, Е.С. Зубкова<sup>2</sup>, А.А. Слепцов<sup>3</sup>, М.С. Назаренко<sup>3</sup>, Н.В. Желтышева<sup>1</sup>, В.А. Шевченко<sup>1</sup>, М.В. Ежов<sup>2</sup>, В.В. Кухарчук<sup>2</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>2</sup>, С.М. Закиян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН*  
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова*  
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

<sup>3</sup> *Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*  
634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10

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

**Ключевые слова:** семейная гиперхолестеринемия, клеточные модели заболеваний, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные производные, эндотелиоциты, гепатоциты, органоиды.

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — наследственное моногенное заболевание, являющееся одной из причин атеросклероза, который лежит в основе сердечно-сосудистых патологий [1]. Большинство случаев заболевания связаны с патологическими вариантами в гене рецептора липопротеинов низкой плотности *LDLR*.

Моделирование СГХС имеет важное значение для разработки новых подходов к лечению. Создание клеточных моделей на основе дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов является перспективной стратегией, поскольку позволяет воспроизвести признаки патологии на релевантных клеточных типах: гепатоцитах и эндотелиоцитах — и таргетно тестировать потенциальные лекарственные препараты. В настоящее время в мире существует менее десятка 2D-моделей, представленных только одним типом клеток, вовлеченных в заболевание, — гепатоцит-подобными клетками. Однако такие дифференцированные производные функционально являются незрелыми — паттерн их генной экспрессии напоминает клетки эмбриональной печени. В то время как 3D-васкуляризированные органоиды с гепатоцитами-производными ИПСК напоминают зрелые гепатоциты.

В данной работе в результате репрограммирования мононуклеарных клеток крови трех пациентов, являющихся компаундными гетерозиготами по патологическим аллельным вариантам гена *LDLR*, получены ИПСК, демонстрирующие свойства плюрипотентности и нормальный кариотип [2–5]. Наличие аллельных вариантов в ИПСК подтверждено секвенированием. Из ИПСК пациентов с СГХС путем направленной дифференцировки получены три типа дифференцированных производных: гепатоцит-подобные клетки, эндотелиоциты и мезенхимные стромальные клетки (МСК) с подтверждением наличия характерных маркеров для каждого типа клеток. Эндотелиальные и МСК-производные получены для пациентов с СГХС впервые. Дифференцированные производные имеют сниженную способность поглощать ЛПНП, что является функциональным подтверждением воспроизведения патологического фенотипа заболевания.

В результате объединения трех типов полученных дифференцированных производных впервые получены васкуляризированные гепато-органоиды пациентов с СГХС, которые станут платформой для разработки подходов к более эффективной терапии СГХС и атеросклероза. Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00065.

#### Литература

1. Semenova AE, Sergienko IV, García-Giustiniani D et al. *J. Cardiovasc Dev. Dis.* 2020;7(2):16.
2. Nazarenko MS, Sleptcov AA, Zarubin AA et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):4471.
3. Zakharova IS, Shevchenko AI, Tmoyan NA et al. *Stem Cell Res.* 2022;60:102703.
4. Zakharova IS, Shevchenko AI, Tmoyan NA et al. *Stem Cell Res.* 2022;60:102702.
5. Zakharova IS, Shevchenko AI, Tmoyan NA et al. *Stem Cell Res.* 2022;59:102653.

### CELL MODELS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN THE FIGHT AGAINST CARDIOVASCULAR DISEASES

I.S. Zakharova<sup>1\*</sup>, A.I. Shevchenko<sup>1</sup>, N.A. Tmoyan<sup>2</sup>, E.A. Elisaphenko<sup>1</sup>, E.S. Zubkova<sup>2</sup>, A.A. Sleptcov<sup>3</sup>, M.S. Nazarenko<sup>3</sup>, N.V. Zheltyшева<sup>1</sup>, V.A. Shevchenko<sup>1</sup>, M.V. Ezhov<sup>2</sup>, V.V. Kukharchuk<sup>2</sup>, Y.V. Parfyonova<sup>2</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences*

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10

<sup>2</sup> *National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation*

121552, Moscow, st. 3rd Cherepkovskaya, 15a

<sup>3</sup> *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science*

634050, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10

\*e-mail: zakharova.is@gmail.com

**Keywords:** familial hypercholesterolemia, cell models of diseases, induced pluripotent stem cells, differentiated derivatives, endotheliocytes, hepatocytes, organoids.

### КОРОТКИЙ АРГОНАВТ АКТИВИРУЕТ НУКЛЕАЗУ ДЛЯ ЗАЩИТЫ БАКТЕРИЙ ОТ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

A.A. Каневская<sup>1</sup>, В.А. Пантелеев<sup>1</sup>, Л.А. Лисицкая<sup>1</sup>, К.В. Тугаева<sup>2</sup>, Н.Н. Случанко<sup>2</sup>, Д.М. Есюнина<sup>1</sup>, А.В. Кульбачинский<sup>1\*</sup>, М.А. Простова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Институт биологии гена Российской академии наук*  
119071, Москва, ул. Вавилова, дом 34/5

<sup>2</sup> *Институт биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук*

119334, Москва, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2

\*e-mail: annakanevskaia@yandex.ru

**Ключевые слова:** белки-аргонавы прокариот, короткие аргонавы, программируемые нуклеазы, системы защиты прокариот, биосенсоры.

Белки-аргонавы способны узнавать нуклеиновые кислоты с использованием комплементарных гидовых молекул. Многие из них обладают каталитической активностью и являются программируемыми нуклеазами. Эукариотические аргонавы играют центральную роль в РНК-интерференции и к настоящему времени изучены достаточно хорошо. Прокариотические аргонавы изучены значительно хуже, однако известно, что они имеют более разнообразную структуру и свойства, чем аргонавы эукариот.

По структуре прокариотические аргонавы можно разделить на две группы: длинные аргонавы и короткие аргонавы. В отличие от длинных аргонавов, короткие аргонавы содержат только два домена: MID-домен и PIV1-домен — при этом последний не имеет нуклеазной активности, так как в нем отсутствует каталитическая тетрада. Однако часто рядом с коротким аргонавом закодирован белок, содержащий так называемый домен APAZ, и дополнительные домены, отличающиеся большим разнообразием. Показано, что APAZ подобен N-концевому домену длинных аргонавов, а дополнительные домены могут иметь разнообразную предсказанную активность.

Данная работа посвящена короткому аргонаву из галофильной бактерии *Novosphingopyxis baekryungensis* (NbaAgo), который ассоциирован с белком-партнером, содержащим домены DUF4365 и APAZ. Мы показали, что NbaAgo вместе с белком DUF4365-APAZ образуют гетеродимерный комплекс, названный нами SPARDA (short prokaryotic Argonaute and DNase/RNase-APAZ). При связывании РНК-гида и комплементарной ему ДНК-мишени SPARDA проявляет неспецифическую нуклеазную активность как на оцДНК и дцДНК, так и на РНК. Мы показали, что при фаговой инфекции или в присутствии чужеродной плазмиды комплекс SPARDA активируется и убивает клетку, тем самым защищая бактериальную популяцию. Кроме того, способность SPARDA проявлять нуклеазную активность при распознавании ДНК-мишени позволяет использовать его в высокочувствительных тест-системах для обнаружения специфической ДНК. Таким образом, SPARDA является новой системой защиты прокариот от чужеродной ДНК и открывает новые перспективы в биотехнологии. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 22-14-00182).

### SHORT ARGONAUTE ACTIVATES ASSOCIATED NUCLEASE TO PROTECT BACTERIA FROM INVADER DNA

A.A. Kanevskaya<sup>1</sup>, V.A. Panteleev<sup>1</sup>, L.A. Lisitskaya<sup>1</sup>, K.V. Tugaeva<sup>2</sup>, N.N. Sluchanko<sup>2</sup>, D.M. Esyunina<sup>1</sup>, A.V. Kulbachinskiy<sup>1\*</sup>, M.A. Prostova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, 34/5 Vavilova Street

<sup>2</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences

119071, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2

\*e-mail: annakanevskaja@yandex.ru

**Keywords:** prokaryotic argonaute proteins, short argonautes, programmable nucleases, prokaryotic defence systems, biosensors.

### ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ КАК ИНСТРУМЕНТ НОВОЙ ЗЕЛЁНОЙ РЕВОЛЮЦИИ

A.A. Киселёва<sup>1,2\*</sup>, E.A. Салина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Курчатowski genomic center, Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** геномное редактирование растений, сельскохозяйственные растения.

В ходе Зелёной революции 1960-х годов были созданы продуктивные сорта сельскохозяйственных растений, однако сейчас возникают новые проблемы, связанные с адаптацией этих сортов к быстро изменяющимся климатическим условиям и необходимости дальнейшего повышения урожайности в рамках интенсификации сельского хозяйства [1]. Исследования в области геномного редактирования представляют собой новую стратегию для улучшения сортов, созданных в ходе Зеленой революции. Например, путем редактирования генетического фактора ZnF-DELLA, участвующего в сигнальном пути brassinosteroidов, были получены растения пшеницы с полукарликовым фенотипом и повышенной урожайностью, независимо от *Rht-1* генов («гены Зелёной Революции»), снижающих эффективность использования азота и фиксации углерода, что приводит к снижению биомассы, размера колоса и массы зерна [2]. Для модификации другого признака, важного для увеличения адаптивности и урожайности сельскохозяйственных растений, чувствительности к фотопериоду (длине дня), мы выбрали гены *Ppd-1*. Полученная в ходе работы коллекция растений с мутациями в промоторной области этих генов, позволяет изучить и прицельно изменить последовательности, модулирующие экспрессию *Ppd-1*, от которой зависит восприимчивость растения к длине дня. Таким образом, современные инструменты биоинженерии позволяют обойти ограничения традиционных методов улучшения сельскохозяйственных культур и предлагают альтернативные подходы для увеличения урожайности, качества зерна, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Данная работа

выполнена при поддержке Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (№ 075-15-2019-1662).

#### Литература

1. Awan MJA, Pervaiz K, Rasheed A et al. Genome edited wheat- current advances for the second green revolution. *Biotechnol Adv.* 2022;60:108006. doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.108006.
2. Song L, Liu J, Cao B et al. Reducing brassinosteroid signalling enhances grain yield in semi-dwarf wheat. *Nature.* 2023;617(7959):118–124. doi: 10.1038/s41586-023-06023-6.

### PLANT GENOME EDITING IS AN APPROACH FOR THE NEW GREEN REVOLUTION

A.A. Kiseleva<sup>1,2\*</sup>, E.A. Salina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10

<sup>2</sup> Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10

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

**Keywords:** plant genome editing, agricultural plants.

### ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ФИЛАМИНА С (FLNC) НА ДИНАМИКУ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

E.C. Клименко<sup>1\*</sup>, A.K. Зайцева<sup>1</sup>, A.A. Костарева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

<sup>2</sup> Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet

171 77, Stockholm

\*e-mail: klimenko\_es@almazovcentre.com

**Ключевые слова:** филамин С, кардиомиопатия, иПСК, кальциевый имиджинг, электростимуляция.

Филамин С, кодируемый геном *FLNC*, имеет большое значение для обеспечения механической целостности саркомера в мышечных клетках. Мутации в этом гене ассоциированы с различными фенотипическими вариантами миопатий и кардиомиопатий. Важными компонентами нарушения функциональной активности мышечных клеток вследствие дефектов филамина могут являться изменение кальциевой динамики и клеточного дыхания, поскольку перестройка актинового цитоскелета и структуры Z-дисков саркомера при мутациях *FLNC* может нарушить взаимосвязь саркоплазматического ретикулума, митохондрий и каналов наружной клеточной мембраны.

Один из предполагаемых механизмов развития аритмогенности филаминопатий связан с токсичностью филаминовых агрегатов, нарушением процессов ауто- и митофагии, внутриклеточного транспорта, что может приводить к нарушению локализации каналов на мембране. Другим следствием может быть неэффективная дифференцировка, приводящая к изменению профиля экспрессии потенциал-зависимых ионных каналов.

В ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» были обследованы пациенты с заболеваниями сердца, ассоциированными с филаминопатией. Первый пациент имеет мутацию *FLNC* V2264M в 20 домене, сопровождающуюся развитием рестриктивной кардиомиопатии

и формированием белковых агрегатов. У второго пациента заболевание связано с нарушениями ритма, формированием желудочковой тахикардии и ассоциировано с loss-of-function мутацией *FLNC* R1267Q в 11 домене. Полученные от пациентов и здоровых доноров клеточные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека дифференцировались в кардиомиоциты (КМ-иПСК) на протяжении 45 дней и далее были взяты для экспериментов по исследованию кальциевых транзиентов, индуцированных электро-стимуляцией, с использованием кальций-чувствительного флуоресцентного зонда Fura-2AM на установке IonOptix (IonOptix, USA). Для КМ-иПСК с мутацией *FLNC* V2264M характерно уменьшение амплитуды на 19% и времени нарастания кальциевого транзиента на 24% по сравнению с КМ-иПСК здоровых доноров. У КМ-иПСК с мутацией *FLNC* R1267Q обнаруживается увеличение длительности кальциевого транзиента за счет замедления процессов восстановления концентрации кальция: уменьшение скорости возврата к базальной концентрации кальция на 35%; уменьшение времени восстановления на 49% и общей длительности кальциевого транзиента на 36% по сравнению с КМ-иПСК здоровых доноров.

Таким образом, механизмы аритмогенеза у обоих пациентов отличаются в следствие мутаций в разных структурных доменах и сопровождаются различными клиническими проявлениями. Финансовая поддержка: грант № 20-15-00271П.

## FILAMIN C (FLNC) GENE MUTATIONS COULD CHANGE THE CALCIUM IONS DYNAMICS

E.S. Klimenko<sup>1\*</sup>, A.K. Zaytseva<sup>1</sup>, A.A. Kostareva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Almazov National Medical Research Centre*  
197341, St. Petersburg, Akkuratova street, 2

<sup>2</sup> *Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet*  
171 77, Stockholm

\*e-mail: klimenko\_es@almazovcentre.com

**Keywords:** filamin C, cardiomyopathy, iPSC, calcium imaging, electrical stimulation.

## РАННИЕ НАРУШЕНИЯ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА ВЫЗВАННОЙ МУТАЦИЕЙ G2019S В КИНАЗЕ LRRK2, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ

И.В. Копылова<sup>1</sup>, А.Н. Казакова<sup>1</sup>, В.О. Шендер<sup>1</sup>, Г.П. Арапиди<sup>1</sup>, Д.А. Грехнев<sup>2</sup>, В.А. Вигонт<sup>2</sup>, Е.И. Шарова<sup>1</sup>, Л.О. Скородумова<sup>1</sup>, Е.В. Казначеева<sup>2</sup>, А.Н. Богомазова<sup>1,3</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1</sup>, О.С. Лебедева<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> *ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА*  
119435, Москва, Малая Пироговская 1а

<sup>2</sup> *ФГБУН Институт цитологии РАН*  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

<sup>3</sup> *Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА*  
119435 Москва, ул. Малая Пироговская 1А

\*e-mail: oslebedeva@rcpcm.org

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, изогенные модели, дофаминергические нейроны, болезнь Паркинсона, омиксные технологии, секвенирование РНК единичных клеток, депо-управляемый вход кальция.

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, вызванное гибелью дофаминергических нейронов (ДАН) чёрной субстанции. Наиболее частая причина наследственных форм БП — мутации в гене *PARK8*, кодирующем киназу LRRK2, которая участвует в ряде клеточных процессов, в том числе в регуляции везикулярного транспорта, обмене митохондрий, аутофагии. Аутосомно-доминантная мутация G2019S в LRRK2 приводит к усилению киназной активности белка, рассматриваемой как фактор патогенеза. Предмет нашего исследования — инициаторные молекулярные события БП, ассоциированной с мутацией G2019S. С помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с различными аллельными состояниями гена *PARK8* по мутации G2019S (del/del, del/wt, wt/wt, wt/mut, mut/mut). Полученные с помощью направленной дифференцировки ДАН были охарактеризованы с использованием проточной цитофлуориметрии, HPLC, Patch-clamp и иммуноцитохимических методов. Постмитотические функционально активные ДАН были собраны для секвенирования РНК единичных клеток, транскриптомного, протеомного и фосфопротеомного анализов.

На зрелых ДАН были продемонстрированы различия в локализации и количестве аутофагосом и митохондрий в зависимости от состояния гена *PARK8*. Полученные результаты согласуются с данными литературы и подтверждают валидность модели.

Полученные ДАН имеют транскриптомный профиль, аналогичный ранее опубликованным данным для ДАН, и имеют высокий уровень экспрессии маркеров зрелости. При БП погибают ДАН компактной части чёрной субстанции, в то время как сходные с ними ДАН вентральной области покрывки не дегенерируют. Доля чувствительных (SOX6+) ДАН в полученной нами популяции, рассчитанная по уровню экспрессии генов, выше, чем резистентных (CALB+). Электрофизиологические исследования ДАН подтвердили их электровозбудимость и показали, что мутация в гене *PARK8* связана с усилением депо-управляемого входа кальция.

В результате секвенирования РНК единичных клеток в исследуемой популяции ДАН было выделено 5 кластеров, три из которых представляют собой нейрональные предшественники и два — взрослые нейроны. По результатам фосфопротеомного анализа был определен круг потенциальных белков-мишеней LRRK2. С помощью протеомного и транскриптомного анализов культур ДАН были выявлены дифференциально экспрессированные гены и изменения в протеоме. Результаты омиксных исследований указывают на ассоциацию состава внеклеточного матрикса, регуляции метаболизма нуклеиновых кислот и экспрессии генов врожденного иммунного ответа с мутацией G2019S, что предполагает роль данных процессов в нейродегенерации. Работа выполнена при поддержке гранта 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования («Создание центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины»).

### EARLY DISTURBANCES IN DOPAMINERGIC NEURONS IN PARKINSON'S DISEASE CAUSED BY G2019S MUTATION IN LRRK2 KINASE DETECTED IN ISOGENIC CELL MODEL

I.V. Kopylova<sup>1</sup>, A.N. Kazakova<sup>1</sup>, V.O. Shender<sup>1</sup>, G.P. Arapidi<sup>1</sup>, D.A. Grekhnev<sup>2</sup>, V.A. Vigont<sup>2</sup>, E.I. Sharova<sup>1</sup>, L.O. Skorodumova<sup>1</sup>, E.V. Kaznacheyeva<sup>2</sup>, A.N. Bogomazova<sup>1,3</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1</sup>, O.S. Lebedeva<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency

119435, Moscow, st. Malaya Pirogovskaya 1A.

<sup>2</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences 194064, St. Petersburg, Tikhoretsky prospect 4

<sup>3</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency 119435 Moscow, st. Malaya Pirogovskaya 1A

\*e-mail: oslebedeva@rcpcm.org

**Keywords:** induced pluripotent stem cells, isogenic models, dopaminergic neurons, Parkinson's disease, omics technologies, single cell RNA sequencing, store-operated calcium entry.

### ПОЛУЧЕНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В МОЛОКО С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Д.С. Коршунова, П.Д. Сафонова, Ю.Д. Окулова, Ю.Ю. Силаева, М.В. Шепелев\*

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

\*e-mail: mshepelev@mail.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, гуманизация, трансгенные животные, рекомбинантные белки, антитромбин III, ингибитор C1-эстеразы.

Продукция рекомбинантных терапевтических белков крови человека в молоко трансгенных животных представляет собой альтернативу традиционным методам получения таких белков в культурах клеток млекопитающих. Используя в качестве модели гены мыши *Serpinc1* и *Serping1*, кодирующие белки крови антитромбин III (АТIII) и ингибитор C1-эстеразы (C1-ИНГ), нами разрабатываются подходы с использованием системы CRISPR/Cas9 к получению гуманизированных животных-продуцентов АТIII и C1-ИНГ человека в молоко.

Для получения продуцентов белков в молоко предложен подход, основанный на CRISPR/Cas9-опосредованном нокине экспрессионной конструкции в локус гена *Csn2* мыши, кодирующего белок молока  $\beta$ -казеин. Для продукции АТIII в молоко осуществлен нокин минигена АТIII человека в локус *Csn2* таким образом, чтобы АТIII продуцировался в молоко вместо  $\beta$ -казеина. Эффективность такого подхода будет сравнена со случайной встройкой в геном конструкций на основе вектора рBC1 для продукции АТIII человека.

Для получения животных, гуманизированных по генам *Serpinc1* и *Serping1*, разработана стратегия CRISPR/

Cas9-опосредованного нокина минигенов АТIII и C1-ИНГ человека в локусы гомологичных генов мыши, что должно приводить к инактивации этих генов и экспрессии минигена человека под контролем регуляторных элементов гена мыши. Эффективность нокина больших фрагментов ДНК с помощью CRISPR/Cas9 при микроинъекциях в зиготы мыши остается низкой, поэтому нами реализуется альтернативная стратегия гуманизации животных, основанная на CRISPR/Cas9-опосредованном нокауте гена животного и восполнении его функции за счет случайной встройки генетической конструкции, несущей миниген человека. Для реализации этого подхода к настоящему времени были получены линии мышей с нокаутом генов *Serpinc1* и *Serping1* и линия мышей со случайной встройкой минигена АТIII человека. Далее, путем скрещивания получают линию гуманизированных животных, несущих миниген человека на генетическом фоне нокаута гена животного. В конечном итоге, скрещивая животных-продуцентов рекомбинантных АТIII или C1-ИНГ в молоко, с линиями животных, гуманизированных по соответствующему гену, получают гуманизированных животных-продуцентов белков в молоко.

Предложенные стратегии гуманизации животных и технологии CRISPR/Cas9-опосредованного нокина больших фрагментов ДНК в зиготах являются универсальными и могут найти применение не только при получении животных-продуцентов белков в молоко, но и при создании животных моделей заболеваний человека и моделей для доклинических исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2019-1661 от 31.10.2019.

### CRISPR/Cas9 MEDIATED GENERATION OF HUMANIZED ANIMALS PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS IN MILK

D.S. Korshunova, P.D. Safonova, Y.D. Okulova, Y.Y. Silaeva, M.V. Shepelev\*

Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences 119334, Moscow, Vavilova Str., 34/5

\*e-mail: mshepelev@mail.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9, humanization, transgenic animals, recombinant proteins, antithrombin III, C1-esterase inhibitor.

### ЭФФЕКТ CRISPR/Cas9 РЕДАКТИРОВАНИЯ ПЛАСТИДНОЙ КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ PHO1A У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* L.

Е.З. Кочиева<sup>1\*</sup>, М.А. Слугина<sup>1</sup>, А.В. Нежданова<sup>1</sup>, Г.И. Ефремов<sup>1</sup>, А.М. Камионская<sup>1</sup>, А.В. Щенникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН 119071, Москва, Ленинский проспект, 33

\*e-mail: ekochieva@yandex.ru

**Ключевые слова:** редактирование генома, метаболизм крахмала, ответ на стресс.

Крахмалфосфорилаза PHO1 является одним из основных пластидных ферментов, осуществляющих

до 96% общей активности фосфорилазы в клетках клубней картофеля. Уникальность данного фермента в том, что PHO1 участвует как в распаде крахмала, так и в инициации его биосинтеза. Более того, что в качестве ключевого фермента метаболизма крахмала PHO1 может участвовать в регуляции реакции картофеля на холодовой стресс и устойчивости клубней к холодному осахариванию.

Система CRISPR/Cas9 использована для редактирования гена PHO1а у четырех сортов картофеля (*S. tuberosum*), различающихся содержанием крахмала в клубнях. Конструкция для редактирования на основе бинарного вектора p201N\_Cas9 содержала кассеты экспрессии gRNA PHO1а под контролем промотора pMTUB, гена Cas9 и гена NPTII устойчивости к канамицину. Штамм агробактерии, несущий плазмиду p201N-PHO1а-gRNA, использован для трансформации стеблевых эксплантов сортов картофеля.

В результате в функциональный домен PHO1а введена радикальная мутация G261V и получено 39 независимых мутантных линий. В сравнении с контролем линии характеризовались измененной морфологией с усиленным образованием корней и побегов.

В корнях и листьях контроля и линий определено содержание крахмала при нормальной температуре и в ответ на холод (3 дня, 4°C). Содержание крахмала в листьях изменялось в сравнении с контролем у редактированных линий, как при нормальных условиях, так и на холоде. В корнях различия были более существенны, что предполагает большее участие фермента PHO1а в метаболизме крахмала в корнях и клубнях по сравнению с листьями.

Анализ экспрессии основных генов распада крахмала в корнях и листьях показал существенные различия почти в половине редактированных линий в сравнении с контролем. Паттерны экспрессии в корнях и листьях значительно различались, что подчеркивает преимущественное значение PHO1а для развития корней по сравнению с листьями.

Мы предполагаем, что мутация G261V изменяет функциональную активность PHO1а, что влияет на работу других ферментов катаболизма крахмала, как в нормальных условиях, так и в условиях холодового стресса. Полученные результаты позволяют сделать вывод о критической регулирующей роли PHO1а в метаболизме крахмала, развитии корней, клубней и побегов, а также в реакции на низкие температуры у картофеля. Работа выполнена при финансовой поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

### EFFECT OF CRISPR/Cas9 EDITING OF PLASTID STARCH PHOSPHORILASE PHO1A IN POTATO *SOLANUM TUBEROSUM* L. VARIETIES

E.Z. Kochieva<sup>1</sup>\*, M.A. Slugina<sup>1</sup>,  
A.V. Nezhdanova<sup>1</sup>, G.I. Efremov<sup>1</sup>,  
A.M. Kamionskaya<sup>1</sup>, A.V. Shchennikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»,  
119071, Moscow, Leninsky pr-t, 33

\* e-mail: ekochieva@yandex.ru

**Keywords:** genome editing, starch metabolism, stress response.

### ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА С АНТРОМБОГЕННЫМ И АНТИМИКРОБНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПОКРЫТИЕМ РАЗЛИЧНОГО ПОЛИМЕРНОГО СОСТАВА

Е.О. Кривкина\*, Л.В. Антонова

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний  
650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

\* e-mail: leonora92@mail.ru

**Ключевые слова:** тканеинженерные сосудистые протезы; биодеградируемые полимеры; антибактериальное покрытие; илопрост; катионные амфилилы.

Тканеинженерный сосудистый протез с пористой стенкой — высокотехнологичное изделие для замены аутологических сосудов. Однако такие протезы могут провоцировать тромбообразование и микробное обсеменение. В связи с этим необходимо модифицировать их поверхность лекарственными препаратами с атромбогенной и антимикробной активностью [1].

Цель — оценить особенности ремоделирования биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра с антимикробным и атромбогенным лекарственным покрытием на модели крупных лабораторных животных.

Сосудистые протезы Ø 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из 12% поли(ε-капролактона) (poly-ε-caprolactone; PCL; Sigma-Aldrich, США) и из 10% поли(3-гидроксипропанат-ко-3-гидроксивалерата)/12% поли(ε-капролактона) на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония) в хлороформе. Проведена дополнительная модификация поверхности изготовленных протезов илопростом и катионным амфилилом по собственной оригинальной методике [2]. Модифицированные протезы PCL/Ilo/A и PHBV/PCL/Ilo/A (n = 12) имплантировали в сонную артерию овец сроком на 6 месяцев. По истечении срока имплантации проведены гистологический, иммунофлуоресцентный анализы эксплантируемых образцов.

Результаты имплантации протезов в сонную артерию овцы показали 50% первичную проходимость через 6 месяцев у PCL/Ilo/A, в то время как в просвете всех PHBV/PCL/Ilo/A имплантов были обнаружены обтурирующие тромбы на тот же момент времени. Гистологический и иммунофлуоресцентный анализы показали формирование неоинтимы из монослоя зрелых эндотелиальных клеток у протезов PCL/Ilo/A, в отличие от протезов PHBV/PCL/Ilo/A, у которых наблюдалось отсутствие эндотелиального слоя на поверхности просвета. Полимерный материал обоих типов имплантатов биодеградировал и заменился новообразованной тканью, содержащей клетки гладкой мускулатуры, макрофаги, белки внеклеточного матрикса, такие как коллагены типа III и IV, и vasa vasorum. Таким образом, биодеградируемые протезы PCL/Ilo/A демонстрируют лучшее ремоделирование, чем имплантаты PHBV/PCL/Ilo/A.

#### Литература

1. Radke D, Jia W, Sharma D et al. Tissue engineering at the blood-contacting surface: a review of challenges and strategies in vascular graft development. *Adv Healthcare Mater.* 2018;7(15):e1701461.
2. Antonova LV, Sevostyanova VV, Rezvova MA et al. Manufacturing technology of functionally active biodegradable vascular prostheses of small diameter with drug coating: Pat. 2702239. Applicant and patent holder Federal State Budgetary Scientific

Institution "Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases" (NII KPSSZ) (RU); No. 2019119912; dec. 06/25/2019; publ. 07.10.2019, Bull. No. 28. (In Russ.).

### FEATURES OF REMODELING OF BIODEGRADABLE VASCULAR PROSTHESES OF SMALL DIAMETER WITH ANTI-THROMBOGENIC AND ANTIMICROBIAL DRUG COATING OF VARIOUS POLYMER COMPOSITION

E.O. Krivkina\*, L.V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
650002, Kemerovo, Sosnovyi bylvar, 6

\* e-mail: leonora92@mail.ru

**Keywords:** tissue-engineered vascular prostheses; biodegradable polymers; antibacterial coating; iloprost; cationic amphiphiles.

### СОЗДАНИЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ С Cas12a ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ КОРЕЦЕПТОРОВ ВИЧ

N.A. Kruglova<sup>1\*</sup>, S.E. Borovikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

\* e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas, редактирование генома, вирусоподобные частицы, доставка CRISPR/Cas в клетки, Cas12a, генотерапия ВИЧ-инфекции.

Одна из актуальных задач в области геномного редактирования — доставка генных редакторов в клетки. Недавно был предложен способ доставки компонентов системы CRISPR/Cas в виде рибонуклеопротеиновых комплексов в составе вирусоподобных частиц на основе лентивирусов [1,2]. Этот инструмент показал высокую эффективность и более низкую токсичность для важных с терапевтической точки зрения клеток по сравнению с другими методами доставки *in vitro*, в частности электропорацией. Потенциально он может быть использован *in vivo* и направлен на определенные клетки-мишени благодаря псевдотипированию. Однако для описанных систем сборки вирусоподобных частиц существует проблема направленной упаковки геновой РНК. Чаще всего геновая РНК экспрессируется с Pol III промотора U6 и находится в ядре, тогда как сборка вирусоподобных частиц с белком Cas происходит на плазматической мембране. Было высказано предположение, что можно повысить эффективность упаковки рибонуклеопротеиновых комплексов Cas/gRNA, если направить геновую РНК в цитоплазму в составе транскрипта полимеразы Pol II и добиться ее эффективного вырезания. Для этого в ранее описанной системе сборки частиц с нуклеазой Cas9 NanoMEDIC использовали рибозимы [1], эффективность работы которых невелика.

Основываясь на системе NanoMEDIC, мы впервые создали вирусоподобные частицы с белком Cas12a, который самостоятельно процессирует геновую РНК в составе длинного транскрипта в цитоплазме клеток. Мы получили экспрессионные плазмиды для сборки

частиц NanoMEDIC с Cas12a, плазмиды для экспрессии геновой РНК с Pol III промотора U6 или Pol II промотора CMV и единую конструкцию, кодирующую Cas12a и геновую РНК под одним промотором. Плазмиды тестировали при электропорации клеток CEM/R5 на генах-мишенях *CXCR4* и *CCR5*, которые являются корецепторами ВИЧ. Вирусоподобные частицы нарабатывали на трансфицированных клетках 293T и концентрировали с помощью ультрацентрифугирования. Эффективность такого редактора оценивали по нокауту генов корецепторов ВИЧ. Замена плазмид для экспрессии геновой РНК с Pol III промотора на плазмиды с Pol II промотором приводила к повышению уровня нокаута. Таким образом, мы показали возможность усовершенствовать инструмент для геномного редактирования NanoMEDIC и успешно использовали его на модели получения устойчивых к инфицированию ВИЧ Т-клеток. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00381).

#### Литература

1. Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature Communications*. 2020;111(11):1–18.
2. Hamilton JR, Tsuchida CA, Nguyen DN et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Reports*. 2021;35(9):109207.

### VIRUS-LIKE PARTICLES WITH Cas12a FOR EDITING HIV CORECEPTORS

N.A. Kruglova<sup>1\*</sup>, S.E. Borovikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences  
119334, Moscow, Vavilova str. 34/5

\* e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas, genome editing, virus-like particles, VLPs, CRISPR/Cas delivery, Cas12a, HIV gene therapy.

### БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ ПРОКАРИОТ: РАЗНООБРАЗИЕ, ФУНКЦИИ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

А.В. Кульбачинский<sup>1,2</sup>, Л.А. Лисицкая<sup>1,2</sup>,  
Е.В. Кропачева<sup>2</sup>, А.А. Каневская<sup>1,2</sup>,  
В.А. Пантелеев<sup>1,2</sup>, М.А. Бескровная<sup>2</sup>,  
Д.К. Аверьянов<sup>2</sup>, А.Ж. Ревель-Муроз<sup>1</sup>, А.В. Тягт<sup>1</sup>,  
М.А. Простова<sup>1</sup>, А.А. Агапов<sup>2</sup>, Д.М. Есюнина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН  
119334, Москва, улица Вавилова, дом 34/5

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

\* e-mail: avkulb@yandex.ru

**Ключевые слова:** белки-аргонавты, программируемые нуклеазы, ДНК-интерференция, редактирование генома, биосенсоры.

Аргонавты — эволюционно консервативное семейство белков, которые способны узнавать и расщеплять целевые нуклеиновые кислоты с помощью коротких геновых олигонуклеотидов. У эукариот белки-аргонавты участвуют в РНК-интерференции, связывая РНК-гиды и РНК-мишени. Белки-аргонавты прокариот (pAgo)



гораздо более разнообразны, а их функции и механизмы действия во многом остаются неизвестными. Мы провели филогенетический анализ и классификацию белков-аргонавтов из полных прокариотических геномов, а также метагеномов кишечника человека. Исследования специфичности белков разных групп показали, что они способны использовать различные комбинации гидов и мишеней, как РНК, так и ДНК. Каталитически активные аргонавты разных групп могут осуществлять направленное расщепление ДНК или РНК. Исследованные аргонавты-нуклеазы могут быть использованы для расщепления нуклеиновых кислот и детекции повреждений в ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*, а также для внесения направленных изменений в целевые участки генома в клетках бактерий. Значительную долю всех белков-аргонавтов составляют каталитически неактивные белки, которые кодируются совместно с дополнительными эффекторными белками. Неактивные аргонавты при узнавании специфических мишеней способны активировать белки-партнеры с неспецифической нуклеазной активностью, что может быть использовано для создания новых методов детекции нуклеиновых кислот. Проведенные исследования показывают, что белки-аргонавты прокариот имеют большие перспективы применения в биоинженерии и генетических технологиях. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение 075-15-2021-1062).

### PROKARYOTIC ARGONAUTE PROTEINS: THEIR DIVERSITY, FUNCTIONS, AND APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY

A.V. Kulbachinskiy<sup>1,2</sup>, L.A. Lisitskaya<sup>1,2</sup>,  
E.V. Kropocheva<sup>2</sup>, A.A. Kanevskaya<sup>1,2</sup>,  
V.A. Panteleev<sup>1,2</sup>, M.A. Beskrovnaya<sup>2</sup>,  
D.K. Averyanov<sup>2</sup>, A.Z. Revel-Muroz<sup>1</sup>, A.V. Tyakht<sup>1</sup>,  
M.A. Prostova<sup>1</sup>, A.A. Agapov<sup>2</sup>, D.M. Esyunina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, Vavilov str., 34/5

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute"

123182 Moscow, Kurchatov sq., 2

\*e-mail: avkulb@yandex.ru

**Keywords:** argonaute proteins, programmable nucleases, DNA interference, genome editing, biosensors.

### РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

О.И. Лаврик<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 8

\*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** редактирование генома, репарация ДНК, транскриптомный анализ, Tdp1, PARP1.

Редактирование генома является одной из ключевых генетических технологий, а система CRISPR/Cas9 — широко используемый инструмент редактирования, основанный на РНК-управляемом расщеплении ДНК-мишени. Репарация ДНК является важным клеточным механизмом в поддержании целостности генома. Системы репарации ДНК направлены на исправление

повреждений, с появлением систем редактирования их изучение получило дополнительный толчок. Нами было исследовано влияние белков репарации, узнающих разрывы в ДНК, на взаимодействие CRISPR/Cas с ДНК-мишенями, а также поли(АДФ-рибозил)ирование (PAR-илирование) Cas9 ферментами PARP1 и PARP2.

Кроме того, мы применили метод редактирования генома CRISPR/Cas9 непосредственно для получения клеточных линий HEK293 с делецией в генах ферментов-участников систем репарации ДНК, то есть нокаутных по этим генам, в том числе по *Tdp1* (тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1) и *PARP1* (поли-АДФ-рибоза полимеразы 1).

PARP1 — фермент, управляющий множеством процессов в клетке посредством посттрансляционной модификации — PAR-илирования, что представляет собой модификацию белков-мишеней разветвленным полимером поли(АДФ-рибозы). PARP1 активируется при взаимодействии с повреждениями ДНК, является сенсором одноцепочечных разрывов. К числу процессов, регулируемых PARP1, относятся репарация и репликация ДНК, управление структурой хроматина, контроль клеточного цикла и другие процессы. Например, известно, что PARP1 контролирует репарацию аддуктов топоизомеразы 1-ДНК, с помощью *Tdp1*, поскольку и топоизомеразы 1, и *Tdp1* модифицируются PARP1. Нами проведен транскриптомный анализ клеток с нокаутом по генам белков репарации *Tdp1* и *PARP1* [1]. Анализ эффекта нокаутов этих генов показал, что наибольшее число дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) наблюдается у мутанта по гену белка PARP1, поскольку этот белок участвует в существенно большем числе клеточных процессов по сравнению с *Tdp1*. Наибольшее число ДЭГ связаны с репарацией, биогенезом рибосом, транскрипцией, а также с протеасомой, апоптозом, контролем клеточного цикла и процессингом белков в эндоплазматическом ретикулуме. Значительная часть изменений, вызванных нокаутом по гену PARP1, затрагивала синтез и процессинг белков.

По данным транскриптомного анализа, при нокауте гена PARP1 уровень нескольких ДЭГ для генов белков-участников эксцизионной репарации оснований ДНК был снижен по сравнению с клетками HEK293 дикого типа. Среди них гены, кодирующие ДНК-гликозилазы (*NEIL1*, *SMUG1*, *MPG*, *NEIL3*), и четыре гена субъединиц ДНК-полимераз (*POLE4*, *POLD2*, *POLD4*, *POLB*). Гены *FEN1* и *NEIL1* являются основными узлами в сети белок-белковых взаимодействий, полученных с помощью Cytoscape. Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 21-64-00017.

#### Литература

1. Dyrkheeva NS et al. Transcriptomic analysis of CRISPR/Cas9-mediated PARP1-knockout cells under the influence of topotecan and TDP1 inhibitor. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5148.

### GENOME EDITING AND DNA REPAIR

О.И. Лаврик<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva 8

\*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

**Keywords:** genome editing, DNA repair, transcriptomic analysis, PARP1, Tdp1.

## ПЕРМАНЕНТНЫЙ ПРОПУСК ЭКЗОНОВ 11–12 В ГЕНЕ *DMD* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕРАПИИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

О.А. Левченко<sup>1\*</sup>, С.И. Нагиева<sup>1</sup>,  
М.И. Зайнитдинова<sup>1</sup>, К.С. Кочергин-  
Никитский<sup>1</sup>, И.О. Панчук<sup>1</sup>, В.Ю. Табаков<sup>1</sup>,  
С.А. Смирнихина<sup>1</sup>, А.В. Лавров<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр им. академика  
Н.П. Бочкова  
115522, Москва, ул. Москворечье, д.1

\*e-mail: olevchenko@med-gen.ru

**Ключевые слова:** *DMD*, мышечная дистрофия Дюшенна, редактирование генома, перманентный экзон-скиппинг.

Мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера — рецессивное X-сцепленное заболевание, вызываемое патогенными вариантами в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин. При данном заболевании существует зависимость тяжести фенотипа от типа патогенного варианта: при мутациях, приводящих к полному или практически полному отсутствию экспрессии дистрофина (LoF-варианты) проявляется более тяжелая форма — миодистрофия Дюшенна (МДД), а при вариантах с укорочением белка или миссенс-вариантах — миодистрофия Беккера или X-сцепленная кардиомиопатия. Среди LoF-вариантов наиболее частыми являются делеции/дупликации одного или нескольких экзонов, короткие инделы, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также преждевременный стоп-кодон или нарушение сайта сплайсинга. В такой ситуации пропуск одного или нескольких экзонов может быть использован для восстановления рамки считывания, либо удаления экзона содержащего патогенный вариант, что приведет к снижению тяжести течения заболевания.

У 1,5% пациентов с МДД выявлены патогенные LoF-варианты в экзонах 11 и 12, пропуск которых *in vitro* был целью данной работы. Для достижения цели в плазмиды с eSpCas9(1.1) (Addgene #71814) или SaCas9 (Addgene #61591) были клонированы восемь направляющих РНК (нРНК) (по 4 для каждой нуклеазы), направленных на интроны 10 и 12 гена *DMD*. Плазмиды индивидуально или попарно трансфицировали в НЕК293Т методом липофекции и в иммортализованные миобласты от здорового донора методом электропорации. Через 72 часа после трансфекции выделяли ДНК и РНК и проводили ПЦР для обнаружения продуктов редактирования. Для оценки эффективности редактирования амплифицированные фрагменты секвенировали по Сэнгеру и анализировали методом TIDE.

В результате экспериментов на клеточной культуре НЕК293Т были отобраны по одной наиболее эффективной паре нРНК для SaCas9 (с эффективностью 20% и 8%) и для SpCas9 (с эффективностью 30% и 25%). Каждая из пар нРНК создавала целевую делецию 11 и 12 экзонов. Кроме того, были выявлены два побочных продукта редактирования: инверсия экзонов 11–12 и кольцевая ДНК, образовавшаяся из делетированного фрагмента. Данный результат подтвержден на культурах клеток миобластов. При анализе кДНК, полученной после редактирования миобластов, выявлено наличие только полноразмерного транскрипта и транскрипта с целевой делецией. Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что наличие побочных продуктов не оказывает существенного влияния на результат эксперимента.

Таким образом, результаты исследования показывают возможность эффективного перманентного

пропуска экзонов 11–12 в гене *DMD* для разработки терапии мышечной дистрофии Дюшенна. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00482.

## PERMANENT SKIPPING OF EXONS 11–12 IN THE *DMD* GENE FOR THE THERAPY OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

O.A. Levchenko<sup>1\*</sup>, S.I. Nagieva<sup>1</sup>, M.I. Zainitdinova<sup>1</sup>,  
K.S. Kochergin-Nikitsky<sup>1</sup>, I.O. Panchuk<sup>1</sup>,  
V.Y. Tabakov<sup>1</sup>, S.A. Smirnikhina<sup>1</sup>, A.V. Lavrov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics  
115522, Moscow, Moskvorechye, 1

\*e-mail: olevchenko@med-gen.ru

**Keywords:** *DMD*, Duchenne muscular dystrophy, genome editing, permanent exon skipping.

## CRISPR SPLIT RNA MAY EMPOWER EFFICIENT MITOCHONDRIAL GENOME EDITING WITH TYPE V Cas12A EFFECTORS

I. Mazunin

Skolkovo Institute of Science and Technology  
121205, Moscow, Bolshoy Boulevard 30, bld. 1

e-mail: I.Mazunin@skoltech.ru

**Keywords:** CRISPR, Cas12a effectors, split crRNA, human mitochondria, RNA import, mtDNA editing.

The use of CRISPR RNAs (crRNAs) in guiding Type V Cas12a nucleases for target DNA cleavage involves a constant repeat-derived 5'-scaffold moiety along with variable 3'-spacer moieties. Our study demonstrated that removing a significant portion of the 20-nucleotide scaffold only minimally affected target DNA cleavage by the *Acidaminococcus sp.* (AsCas12a) Cas12a ortholog. Surprisingly, even in the presence of only a 20-nucleotide crRNA spacer moiety, residual cleavage was observed [1].

We further investigated the catalytic potential of AsCas12a/split crRNAs complex, where scaffold and spacer RNAs are separated. This approach proved highly specific and efficient in cleaving target DNA by AsCas12a, both *in vitro* and in lysates of human cells. In addition to dsDNA target cleavage, split crRNA-programmed AsCas12a also exhibited specific ssDNA target cleavage and non-specific ssDNA degradation (collateral activity). Similar functionality with split crRNAs was observed in V-A effector nucleases from *Francisella novicida* (FnCas12a), *Lachnospiraceae bacterium* (LbCas12a) [1], and *Ruminococcus bromii* (RbCas12a) [2]. Thus, the use of split crRNAs appears to be a general property among V-A effectors.

The widespread application of CRISPR/Cas for editing mitochondrial DNA (mtDNA) has faced obstacles due to a limited understanding of RNA import mechanisms within the mitochondria of mammalian cells. It has been shown that shorter RNA molecules, such as miRNA and siRNA, display greater targeting efficiency, potentially through non-specific means, and can be both detectable and functional. In line with these findings, we conducted a comparison of mitochondrial import between full-sized crRNA and its spacer part only. We discovered that the crRNA spacer moiety alone can be targeted into human mitochondria [3].

The ability to split crRNAs into scaffold and spacer moieties opens up new possibilities, allowing for precise targeting of V-A effectors to mitochondria, an accomplishment not previously achieved. Our recent discovery holds promise in potentially addressing the challenge of crRNA import in human mitochondria. If it works, this finding could pave the way for future treatments of mitochondrial genetic disorders, however, currently our experiments are still ongoing. Work in Mazunin labs was supported by grant from Russian Science Foundation (No. 23-45-10010).

#### References

1. Shebanova R, Nikitchina N, Shebanov N et al. Efficient target cleavage by Type V Cas12a effector programmed with split CRISPR RNA. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(2):1162–1173.
2. Vasilev R, Gunitseva N, Shebanova R et al. Targeted Modification of Mammalian DNA by a Novel Type V Cas12a Endonuclease from *Ruminococcus bromii*. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9289.
3. Nikitchina N, Ulashchik E, Shmanai V et al. Targeting of CRISPR-Cas12a crRNAs into human mitochondria. *Biochimie* (under review).

### АКТУАЛЬНЫЕ ВЫЗОВЫ В ОБЛАСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ОРФАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

П.И. Макаревич<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова  
119192, Москва, Ленинские горы, д. 1

\*e-mail: pmakarevich@mc.msu.ru

**Ключевые слова:** генная терапия, орфанные заболевания, вектор, вирусная частица.

Стремительное развитие генной терапии (ГТ) орфанных заболеваний связано не только с возможностями дизайна векторов и пониманием патогенеза этих тяжелых состояний, но и с быстрым прогрессом биотехнологии, фармацевтики и моделирования болезней на клеточном и организменном уровнях. Практическое применение препаратов для ГТ дает ценную информацию об их эффективности, но также постоянно поднимает вопрос о направлении развития, биобезопасности и этичности их использования, которые требуют систематизации.

Среди вызовов в этой области можно выделить связанные с уровнем развития технологий и принципиальные стратегические задачи, решение которых необходимо для устойчивого развития этой области биомедицины. Технологические задачи, в первую очередь, связаны с таким направлением, как применение вирусных векторов и моделирование орфанных заболеваний для оценки эффективности и безопасности. В связи с уникальной этиологией каждого орфанного заболевания имеется дефицит животных моделей, а также сложности в оценке кинетики и подборе дозы на животных. Все это ставит вопрос о важности технологий редактирования генома (ТРГ) для прецизионного моделирования этих состояний. Аналогично скрининговые исследования, которые целесообразно проводить на моделях *in vitro*, требуют точного внесения мутаций в целевые гены, для которого как нельзя лучше подходят ТРГ. Также важными являются вопросы безопасности вирусных векторов, в том числе аденоассоциированных и лентивирусных, которые стали одними из наиболее популярных платформ для создания препаратов ГТ. Ее оценка на животных

и точная интерпретация данных доклинических исследований являются определяющими для безопасности в клинике. Открытым остается вопрос о долгосрочных последствиях вирусной ГТ, которая при орфанных заболеваниях часто проводится в раннем возрасте, и при длительной выживаемости пациентов может влиять на их состояние в связи с природой вирусных векторных систем, используемых в качестве основы препаратов.

Задачи стратегического толка связаны с выбором показаний, для которого не существует общепринятого алгоритма, а также с редкостью больных подтвержденными орфанными заболеваниями. В этой ситуации потребность в разрабатываемых препаратах измеряется десятками случаев в масштабах стран, а выявление пациентов, которым может быть проведена ГТ, становится отдельной задачей. Не менее важным является адекватное нормативное регулирование обращения препаратов для ГТ орфанных заболеваний, которое в большинстве развивающихся эту область стран включает процедуры ускоренных регистраций и иные подходы, сокращающие время от разработки до внедрения. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

### CURRENT CHALLENGES IN GENE THERAPY FOR ORPHAN DISEASES

P.I. Makarevich<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University  
119192, Moscow, Leninskie gory, 1

\*e-mail: pmakarevich@mc.msu.ru

**Keywords:** gene therapy, orphan diseases, vector, viral particle.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА ПУТЕМ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *FLG* И *KIF3A*

О.Г. Макеев<sup>1,2\*</sup>, А.В. Коротков<sup>1,2</sup>,  
М.А. Десятова<sup>1,2</sup>, Е.А. Шуман<sup>1,2</sup>,  
В.Д. Боковой<sup>1</sup>, А.Б. Антонова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный  
медицинский университет Минздрава России  
620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3

<sup>2</sup> Институт медицинских клеточных технологий  
620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

\*e-mail: larim@yandex.ru

**Ключевые слова:** ген филагрина (*FLG*), ген *KIF3A*, экспрессия, CRISPR/Cas9, эпигенетика, атопический дерматит.

Атопический дерматит — хроническое воспалительное кожное заболевание со склонностью к рецидивирующему течению, для комплексного изучения которого необходима наглядная модель, способная воспроизводить морфологическую и клиническую картину заболевания. В настоящее время подобная модель атопического дерматита отсутствует. Целью данной работы является ее создание на основе блокирования гена филагрина (*FLG*) и *KIF3A* путем их модификации с применением технологии CRISPR/Cas9.

Стартовым фактором патогенеза атопического дерматита считается нарушение функций эпидермального барьера. При этом фактором, обеспечивающим его целостность, является белок филаггрин, играющий определенную роль не только в формировании барьерной функции, но и в иммунном ответе. Кроме того, ранее было выявлено, что нарушение экспрессии гена *KiF3A* также повышает проницаемость кожного барьера, нарушая его целостность и степень гидратации, дополнительно увеличивая риск развития тяжелых форм атопического дерматита у детей. Данная гипотеза находит подтверждение в многочисленных исследованиях. В культуре кератиноцитов крысы путем трансфекции клеток плазмидами, несущими необходимые элементы, был задействован механизм CRISPR/Cas9, заблокировавший экспрессию генов *FLG* и *KiF3A*. При пересадке трансфицированной культуры клеток с нокаутом генов *FLG* и *KiF3A* в хвост грызуна и воздействию на него аллергена (пылевой клещ) наблюдали экзематозные и другие поражения, характерные для развития атопического дерматита.

На основе полученных в ходе исследования результатов был сделан вывод о применимости данного метода для создания модели заболевания и ее дальнейшего использования для разработки методов патогенетической терапии атопического дерматита.

### **SIMULATION OF ADOPIC DERMATITIS BY KNOCKOUT OF FLG AND KiF3A GENES EXPRESSION**

O.G. Makeev<sup>1,2\*</sup>, A.V. Korotkov<sup>1,2</sup>,  
M.A. Desyatova<sup>1,2</sup>, E.A. Shuman<sup>1,2</sup>,  
V.D. Bokovoy<sup>1</sup>, A.B. Antonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ural State Medical University  
620028, Yekaterinburg, Repina st., 3

<sup>2</sup> Institute of Medical Cell Technologies,  
620026, Yekaterinburg, st. Karl Marx, 22 a

\*e-mail: larim@yandex.ru

**Keywords:** filaggrin gene (FLG), KiF3A, expression, CRISPR/CAS9, epigenetics, atopic dermatitis.

### **ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ PARP1 НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СРЕДИННЫХ ШИПИКОВЫХ НЕЙРОНАХ**

V.C. Makeeva\*, S.P. Medvedev,  
S.M. Zakian, A.A. Malakhova

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение Федеральный  
исследовательский центр «Институт цитологии  
и генетики Сибирского отделения Российской  
академии наук»

630090, Новосибирск,  
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

\*e-mail: vladamakkeeva@gmail.com

**Ключевые слова:** болезнь Хантингтона, ингибиторы PARP, биосенсоры, окислительный стресс.

Долгие годы ведутся исследования механизмов и поиски терапевтических подходов для предотвращения развития нейродегенеративных заболеваний, однако до сих пор не найдено эффективного средства. Болезнь

Хантингтона, хотя и вызвана лишь одним фактором — экспансией CAG повторов в первом экзоне гена *HTT*, но обладает большим спектром последующих молекулярных событий. Поэтому разработки терапевтического средства пока не дали результата.

Один из подходов для поиска терапии — тестирование препаратов, уже показавших положительные эффекты при лечении других заболеваний, в частности, онкологии, и имеющих пересечения по молекулярным процессам с болезнью Хантингтона [1, 2]. Так, в ряде работ тестируют ингибиторы фермента PARP1: они предотвращают развитие варианта клеточной смерти («партанатоса»), индуцируемого гиперактивацией PARP-белков, которая возникает из-за интенсивного развития окислительного стресса, сопровождающего нейродегенеративные процессы [3].

Наша цель — создать модельные клеточные линии срединных шипиковых нейронов из ИПСК пациента с болезнью Хантингтона, пригодные для оценки эффективности действия препаратов на основе PARP-ингибиторов. Для этого мы внесли две генетические конструкции, кодирующие биосенсор окислительного стресса GRX1-roGFP2 [4] либо биосенсор стресса ЭПР XBP1-TagRFP [5], и последовательность, кодирующую тетрациклиновый трансактиватор, для регуляции экспрессии биосенсора, с помощью метода CRISPR/Cas9 в локус *AAVS1* ИПСК, полученных из мононуклеарных клеток крови пациента, несущего 46 повторов CAG в гене *HTT*. Также, чтобы усилить развитие стрессового состояния, технологией Sleeping Beauty в геном ИПСК внесли дополнительный фрагмент первого экзона *HTT* с 46 CAG повторами. После характеристики полученных клонов и их дифференцировки в срединные шипиковые нейроны мы планируем протестировать препараты на основе PARP-ингибиторов для оценки их эффекта в условиях, моделирующих развитие болезни Хантингтона. Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

### *Литература*

1. Cardinale A et al. PARP-1 inhibition is neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*. 2015;10(8):1–22.
2. Maiuri T et al. Poly ADP-ribose signaling is dysregulated in Huntington's disease patients. *bioRxiv*. 2022;11.23.517669.
3. Thapa K et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 as a promising drug target for neurodegenerative diseases. *Life Sci*. 2021;267:118975.
4. Gutschner M et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*. 2008;5(6):553–559.
5. Iwawaki T et al. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*. 2004;10(1):98–102.

### **EFFECT OF THE PARP1 INHIBITORS ON OXIDATIVE STRESS IN MEDIUM SPINY NEURONS**

V.S. Makeeva\*, S.P. Medvedev,  
S.M. Zakian, A.A. Malakhova

Federal Research Centre Institute of Cytology and  
Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences

630090, Novosibirsk, Lavrentjev ave. 10

\*e-mail: vladamakkeeva@gmail.com

**Keywords:** Huntington's disease, PARP inhibitors, biosensors, oxidative stress.

## РОЛЬ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ I В РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Малахова\*, В.С. Макеева,  
Е.В. Капитошина, Е.В. Григорьева,  
С.В. Павлова, С.П. Медведев, С.М. Закиян

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, поли(АДФ-рибоза) полимеразы I (PARP1), клеточные модели.

Нейродегенеративные заболевания имеют разную этиологию, однако прослеживаются четкие закономерности в механизмах развития патологических процессов в клетках. Патогенез большинства нейродегенеративных заболеваний связан с накоплением в нейронах агрегатов неправильно свернутых белков: синуклеина при болезни Паркинсона, амилоида при болезни Альцгеймера, хантингтина при болезни Хантингтона и др., — что приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР), дисфункции митохондрий и в конечном итоге к клеточной гибели. Протеинопатии приводят к нарушению процессов аутофагии, а дисфункция митохондрий вызывает развитие окислительного стресса. Система клеточного ответа на накопление aberrантных форм белка направлена на устранение причин развития стресса ЭПР посредством приостановки трансляции белков, запуска системы деградации неправильно свернутых белков, активации шаперонов. При невозможности исправить ситуацию с накоплением aberrантных белков в клетке запускается процесс апоптоза.

Многочисленные исследования подтверждают важную роль PARP1 в развитии нейродегенеративных изменений мозга. Основная роль PARP1 — сенсор одноцепочечных разрывов ДНК. Фермент связывается с ДНК в местах разрывов и начинает синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR) из NAD<sup>+</sup>, привлекая к месту повреждения ферменты репарации ДНК. Гиперактивация PARP1 приводит к истощению пула NAD<sup>+</sup> и избыточному накоплению PAR, вызывая гибель клеток. Парилирование (присоединение PAR) прион-подобных белков способствует их агрегации. Показана роль PARP1 в процессах поддержания стабильности генома, регуляции экспрессии генов, функционировании и биогенезе митохондрий, посттрансляционной модификации и утилизации белков в ЭПР, аутофагии. PARP1 является активным участником развития патологических процессов в нейронах при протеинопатиях, поэтому ингибирование этого фермента позволит предотвратить или замедлить нейродегенерацию. Подавление активности PARP1 будет способствовать снижению уровня гибели нейронов, вызванного накоплением PAR (партанатос), окислительным стрессом (дисфункцией митохондрий в результате истощения запасов энергии в виде NAD<sup>+</sup> и АТФ), а также нарушением процессов аутофагии (через подавление активности SIRT1).

Препараты на основе ингибиторов PARP1 активно разрабатываются и применяются в терапии рака. Изучение действия ингибиторов PARP1 на клеточных моделях на основе дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток позволит выявить общие закономерности, объединяющие патогенез различных нейродегенеративных заболеваний, и подобрать препараты, предотвращающие гибель нейронов. Работа поддержана грантом РФФИ № 23-15-00224.

## THE ROLE OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE I IN THE DEVELOPMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

A.A. Malakhova\*, V.S. Makeeva,  
E.V. Kapitoshina, E.V. Grigor'eva,  
S.V. Pavlova, S.P. Medvedev, S.M. Zakian

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,  
Russian Academy of Sciences  
630090, Novosibirsk, Lavrentjev ave. 10

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

**Keywords:** neurodegenerative diseases, poly(ADP-ribose) polymerase I (PARP 1), cell models.

## ПОДХОДЫ К ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ CRISPR/Cas9-ОПОСРЕДОВАННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ИНТРОНОВ

А.М. Матвеева<sup>1,2\*</sup>, Е.С. Журавлев<sup>1</sup>,  
Д.В. Семенов<sup>1</sup>, В.В. Власов<sup>1</sup>, Г.А. Степанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины, СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\* e-mail: anastasiya.maatveeva@gmail.com

**Ключевые слова:** геномное редактирование, некодирующие РНК, малые ядрышковые РНК, модификации РНК, CRISPR/Cas9, регуляция сплайсинга.

Открытие и совершенствование методов геномного редактирования позволило специфически изменять структуру генов, регулировать экспрессию и функционирование их продуктов в клетках живых организмов. Тем не менее в качестве мишеней до сих пор преимущественно выбирают белок-кодирующие гены с направлением вносимых двуцепочечных разрывов в кодирующие области. В свою очередь, интронные последовательности обладают потенциалом для получения инструментов тонкой регуляции разнообразных клеточных процессов.

Была предложена стратегия редактирования интронов гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5), содержащих гены малых ядрышковых РНК (мяоРНК), с помощью системы CRISPR/Cas9. Функциональный анализ изменений экспрессии генов в полученных линиях клеток человека с различными типами мутаций позволил предложить гипотезу о механизме созревания как самих мяоРНК, так и длинной некодирующей РНК (днкРНК) хост-гена *Gas5* [1].

С помощью точечного редактирования генов индивидуальных С/D-боксов мяоРНК удалось специфически подавить экспрессию мяоРНК-мишеней. При этом наблюдалось созревание новых мутантных форм С/D-боксов РНК. Продемонстрировано образование изоформ зрелой днкРНК *Gas5*, содержащих пропуски экзонов. Анализ результатов позволил сформулировать гипотезу об m6A-зависимой регуляции созревания хост-гена мяоРНК *Gas5*.

На основе клеток человека 293FT были также получены линии клеток с протяженной делецией в одном из аллелей *Gas5* с помощью редактирования одновременно двух генов мяоРНК, закодированных в первом и последнем интронах *Gas5*. Подобная стратегия редактирования позволила осуществить подавление уровня как днкРНК *Gas5*, так и всех интрон-закодированных

C/D-бюкс-мяоРНК. Наблюдаемые результаты легли в основу гипотезы о мяоРНК-зависимом созревании предшественника днкРНК Gas5.

Разработка инструментов модуляции сплайсинга привлекает все больше внимания как подход к тонкой регуляции экспрессии гена без нарушения его структуры. Осуществление модификаций нуклеотидов в составе предшественника мРНК (пре-мРНК) представляет перспективную стратегию влияния на созревание мРНК. В клетках человека 293FT с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации была показана возможность перенаправления активности C/D-бюкс-мяоРНК на пре-мРНК модельного гена *IFTM3*. В условиях активации врожденного иммунного ответа было продемонстрировано снижение уровня зрелой мРНК-мишени по сравнению с контрольными клетками в аналогичных условиях.

Таким образом, инструменты на основе редактирования интронов — многообещающий подход, обладающий потенциалом для применения в различных областях исследований. Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073 и проекта Госзадания ИХБФМ СО РАН (0245-2019-0001) [разработка методов].

#### Литература

1. Filippova JA et al. Are small nucleolar RNAs “CRISPRable”? A report on box C/D small nucleolar RNA editing in human cells. *Front Pharmacol.* 2019;10:1246.

### APPROACHES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS IN HUMAN CELLS BASED ON THE EDITING OF INTRONS WITH CRISPR/Cas9

A.M. Matveeva<sup>1,2\*</sup>, E.S. Zhuravlev<sup>1</sup>,  
D.V. Semenov<sup>1</sup>, V.V. Vlassov<sup>1</sup>, G.A. Stepanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS  
630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Avenue

<sup>2</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, 1 Pirogova str.

\* e-mail: anastasiya.maatveeva@gmail.com

**Keywords:** genome editing, non-coding RNAs, small nucleolar RNAs, RNA modifications, CRISPR/Cas9, splicing regulation.

### КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДО ВСЕМИРНОГО CRISPR-ПОТОПА И ПОСЛЕ

С.П. Медведев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева 10

e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, клеточные модели, ИПСК, CRISPR-Cas.

Нейродегенеративные заболевания занимают значительную долю в структуре заболеваемости по всему миру. В связи с увеличением среднего возраста населения в большинстве развитых стран резко возрастает доля пациентов с такими диагнозами, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Дефицит эффективных подходов к терапии данных болезней во многом связан с отсутствием системных знаний о механизмах реализации генетической

информации (генетических вариантов) при формировании патологических фенотипов на уровне живой клетки, ткани, органа и целого организма. Данная проблема усугубляется еще и тем, что разнообразие генетических вариантов, которые непосредственно приводят к развитию патологических состояний нервной системы или повышают риск их возникновения, крайне велико. На сегодняшний день известны сотни генов и тысячи аллельных вариантов, которые ассоциированы с патологиями развития нервной системы и нарушениями ее функционирования в течение жизни. Кроме того, одной из проблем является недостаток адекватных моделей, которые пригодны для проведения скрининговых исследований *in vitro*, поиска новых генов и генетических вариантов, вовлеченных в формирование патологических состояний, обнаружения потенциальных молекул-мишеней для терапии, функциональной проверки генетических вариантов, которые были найдены в ходе компьютерного анализа биологических данных и тестирования возможных средств терапии. Развитие технологий индуцированной плюрипотентности, направленной дифференцировки плюрипотентных клеток человека в релевантные типы клеток *in vitro*, а также редактирования нуклеотидных последовательностей с помощью программируемых нуклеаз позволяет существенно расширить арсенал инструментов для решения вышеописанных проблем. В докладе будет представлен обзор данных о прогрессе в использовании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и направленного редактирования геномов для создания моделей нейродегенеративных заболеваний, а также о возникающих при этом проблемах и путях их решений. Работа финансируется в рамках бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0015.

### CELL MODELS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES BEFORE THE GLOBAL CRISPR FLOOD AND AFTER

S.P. Medvedev

The Federal Research Center “Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10

e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

**Keywords:** neurodegenerative diseases, cell models, iPSCs, CRISPR-Cas.

### РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е.С. Минская<sup>1</sup>, Е.В. Лапшин<sup>1</sup>,  
А.В. Ряполова<sup>1</sup>, Д.Т. Гурциева<sup>1</sup>, А.Н. Бровин<sup>1</sup>,  
В.Д. Мороз<sup>1</sup>, А.Д. Егоров<sup>1</sup>, Н.Б. Гасанов<sup>1</sup>,  
Б.Н. Крапивин<sup>1</sup>, А.В. Карабельский<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Научно-технологический университет «Сириус»  
354340, Краснодарский край, г.гт. Сириус, Олимпийский пр. 1

\* e-mail: karabelskiy.av@siriusuniversity.ru

**Ключевые слова:** рекомбинантный вирус, виро-терапия, генозаместительная терапия, наследственные заболевания, AAV, VSV, онкологические заболевания.

Рекомбинантные вирусные векторы на основе аде-ноассоциированных вирусов (AAV) и вируса везикулярного стоматита (VSV) являются эффективными инструментами доставки терапевтических генов для

лечения наследственных и резистентных онкологических заболеваний.

Наследственная оптическая нейропатия Лебера — митохондриальное заболевание, при котором отмирают ганглиозные клетки сетчатки и их аксоны, что приводит к потере центрального зрения [1]. Мутации в генах, кодирующих белки электрон-транспортной цепи, приводят к снижению количества АТФ, избыточной продукции активных форм кислорода (АФК) и повышенной концентрации  $Ca^{2+}$ . На модели первичных фибробластов с мутацией R340H в белке ND4 с использованием сенсоров АФК и  $Ca^{2+}$  было показано снижение количества АФК и нормализация уровня  $Ca^{2+}$  в митохондриях при аллелотипической экспрессии ND4 после трансдукции клеток векторами AAV, а также проведён скрининг сигналов митохондриальной локализации.

Мутации в гене ретинолдегидрогеназы 12 (RDH12), участвующей в цикле зрительной фототрансдукции, вызывают врожденный амвроз Лебера 13 типа и пигментный ретинит 53 типа. Патогенез связан с накоплением промежуточных метаболитов зрительного цикла и аддуктов перекисного окисления [2]. Функциональный анализ двух вариантов RDH12, доставляемых AAV8 и AAV9, на модели HEK293 и клетках пигментного эпителия сетчатки человека ARPE19 показал повышение устойчивости AAV-трансдуцированных клеток к цитотоксическому агенту 4-гидроксинафеналу, промежуточному метаболиту зрительного цикла фототрансдукции и активатору апоптоза клеток.

Селективная репликация онколитических вирусов в опухолевых клетках и активация иммунного ответа хозяина приводят к избирательной гибели преимущественно злокачественных клеток [3]. В *in vivo* исследовании, проведенном на сингенной модели меланомы у мышей C57BL/6, процент торможения роста опухоли (ТРО) относительно контрольной группы достиг максимума в 52,5% и 41,8% при интратуморальной инъекции  $1 \times 10^8$  и  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> VSV-GFP соответственно. Уровень смертности был выше в плацебо группе мышей, чем у экспериментальных групп. VSV-GFP оставался активным в опухоли минимум на протяжении 21 дня, что было подтверждено конфокальной микроскопией. Финансирование проектов осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-10-2021-093; GTH-RND-2011; GTH-RND-2112; GTH-RND-2113).

#### Литература

1. Hage R, Vignal-Clermont C. Leber hereditary optic neuropathy: Review of treatment and management. *Front Neurol*. 2021;12:651639.
2. Fahim AT, Thompson DA. Natural history and genotype-phenotype correlations in RDH12-associated retinal degeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1185:209–213.
3. Macedo N, Miller DM, Haq R, Kaufman HL. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2020;8(2):e001486.

#### DEVELOPMENT OF RECOMBINANT VIRUSES FOR THE THERAPY OF ONCOLOGICAL AND HEREDITARY DISEASES

E.S. Minskaia<sup>1</sup>, E.V. Lapshin<sup>1</sup>, A.V. Ryapolova<sup>1</sup>, D.T. Gurtsieva<sup>1</sup>, A.N. Brovin<sup>1</sup>, V.D. Moroz<sup>1</sup>, A.D. Egorov<sup>1</sup>, N.B. Gasanov<sup>1</sup>, B.N. Krapivin<sup>1</sup>, A.V. Karabelsky<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Sirius University of Science and Technology*  
354340, Krasnodar Region, Sirius, Olympiyskiy Prospect 1

\* e-mail: karabelskiy.av@siriusuniversity.ru

**Keywords:** recombinant virus, virotherapy, gene replacement therapy, hereditary diseases, AAV, VSV, oncological diseases.

#### ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGF) В РЕАЛИЗАЦИЮ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

A.O. Монакова<sup>1,2\*</sup>, Г.Д. Сагарадзе<sup>2</sup>,  
Н.А. Басалова<sup>1,2</sup>, В.С. Попов<sup>1,2</sup>,  
В.Ю. Балабаньян<sup>1,2</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

119991, Москва, Ломоносовский проспект, 27/1

<sup>2</sup> *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27/10

\* e-mail: monakova-anya@mail.ru

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, секретом, VEGF, мужское бесплодие, сперматогенез, макрофаги, сперматогиональные стволовые клетки, клетки Сертоли.

Мужское бесплодие относится к заболеваниям с неудовлетворённой медицинской потребностью, поэтому поиск новых эффективных и безопасных методов его лечения является актуальной задачей. Ранее мы показали эффективность секретом мезенхимных стромальных клеток (МСК) на двух моделях нарушения сперматогенеза у грызунов. Для дальнейшей разработки препарата необходимо изучение механизмов действия, в том числе выявление ключевых факторов и мишеней.

Для изучения потенциальных ключевых компонентов мы смоделировали повреждение сперматогенеза у мышей с помощью 10 внутривбрюшинных инъекций доксорубина в суммарной дозе 10 мг/кг. Разным животным вводили локально под белочную оболочку яичка секретом МСК, секретом МСК с антителами к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), секретом МСК с антителами к фактору роста из глиальных клеток (GDNF) или фракцию секретом МСК без внеклеточных везикул. Восстановление сперматогенеза оценивали с помощью гистологического анализа срезов семенников, окрашенных гематоксилин-эозином, и подсчётом сперматозоидов в гомогенате придатков. Основные клеточные мишени анализировали иммуногистохимическим анализом с антителами к PCNA (маркёр активно делящихся клеток дифферона сперматогиональных стволовых клеток), SOX9 (маркёр клеток Сертоли), CD163 (маркёр M2-макрофагов).

Общее количество сперматозоидов, число подвижных сперматозоидов, а также нормальных и восстанавливающихся семенных канальцев увеличивалось у животных, получивших инъекцию секретом МСК по сравнению с контрольной группой нелеченных животных. Блокирование VEGF антителами привело к снижению регенераторного эффекта секретом МСК, однако нейтрализация GDNF или удаление внеклеточных везикул не повлияло на эффект секретом МСК. Дальнейший иммуногистохимический анализ показал, что при введении секретом МСК наблюдается тенденция к частичному восстановлению нормального клеточного состава, а именно: снижению количества CD163+ макрофагов, снижению SOX9+ клеток Сертоли, увеличению PCNA+ активно делящихся клеток дифферона сперматогиональных стволовых клеток. В группе, которой вводился

секретом МСК с антителами к VEGF, клеточные эффекты секретома МСК были снижены и сопоставимы с группой с повреждением без терапии.

Таким образом, ключевым фактором в секретома МСК для восстановления сперматогенеза может являться VEGF, в то время как GDNF и BV не вносят существенного вклада в реализацию эффекта секретома МСК. Среди клеточных мишеней секретома МСК можно рассматривать M2-макрофаги, клетки Сертоли и клетки дифферона ССК, однако это требует дальнейших исследований. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>.

### CONTRIBUTION OF VEGF TO THE REGENERATIVE EFFECTS OF MSC SECRETOME IN SPERMATOGENESIS RECOVERY

A.O. Monakova<sup>1,2\*</sup>, G.D. Sagaradze<sup>2</sup>, N.A. Basalova<sup>1,2</sup>, V.S. Popov<sup>1,2</sup>, V.Yu. Balabanyan<sup>1,2</sup>, A.Yu. Efimenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine

119992, Moscow, Lomonosovsky av., 27/10

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center

119991, Moscow, Lomonosovsky av., 27/1

\*e-mail: monakova-anya@mail.ru

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, secretome, VEGF, male infertility, spermatogenesis, macrophages, spermatogonial stem cells, Sertoli cells.

### ПОДХОДЫ К РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

Д.С. Новопашина<sup>1\*</sup>, Л.В. Саковина<sup>2</sup>, Е.С. Горленко<sup>1,2</sup>, Е.В. Иванская<sup>2</sup>, О.А. Должикова<sup>1,2</sup>, М.И. Мещанинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*e-mail: danov@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** регулируемая система CRISPR/Cas9, УФ-облучение, аллостерическая регуляция, направляющие РНК, фоторасщепляемый линкер, фотоблокирующие олигонуклеотиды.

Повышение эффективности и точности систем геномного редактирования является актуальной задачей современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Особый интерес вызывает создание регулируемых систем CRISPR/Cas, активностью которых можно управлять с различных физико-химических стимулов, такие как, облучение светом, изменение pH, температура, изменение концентраций определенных веществ и др. Многообещающим направлением в этой области является разработка подходов к регуляции активности на уровне направляющей РНК за счет введения определенных модификаций в структуру и последовательность направляющей РНК, а также вспомогательных олигонуклеотидов.

Целью данной работы является создание регулируемых систем CRISPR/Cas9 с использованием модифицированных направляющих РНК и блокирующих олигонуклеотидов.

Нами было выбрано два варианта регуляции системы: облучение светом определенной длины волны и аллостерическая регуляция. Был проведен дизайн и синтез линейных и циклических фоторасщепляемых направляющих РНК и вспомогательных олигонуклеотидов. Линейные направляющие РНК содержали фоторасщепляемые линкеры, позволяющие разрушить РНК путем облучения и таким образом отключить систему редактирования в определенный момент времени. Циклические направляющие РНК не активны вплоть до облучения, а в результате облучения происходит их линеаризация и активация системы. Линейные фоторасщепляемые блокирующие олигонуклеотиды ингибируют расщепление ДНК-мишени до облучения, а циклические — после облучения. Еще один вариант направляющих РНК содержал в своем составе линкеры на основе азобензола, изменяющего свою конформацию при облучении. Облучение в УФ-диапазоне приводит к переходу молекулы в цис-изомер, а облучение в видимом диапазоне приводит к образованию транс-изомера. Такой вариант модификации РНК позволяет обратимо изменять ее пространственную структуру и влиять на сродство РНК к ДНК-мишени, а также к белку Cas9, активируя или инактивируя систему геномного редактирования в зависимости от длины волны облучения. Для создания систем с аллостерической регуляцией нами были созданы направляющие РНК с внедренными в их структуру аптамером к теофиллину. В зависимости от положения аптамера в составе направляющей РНК система CRISPR/Cas9 может как активироваться, так и дезактивироваться в присутствии теофиллина.

Нами предложены подходы к созданию систем CRISPR/Cas9, действие которых можно регулировать светом или аллостерически. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 22-14-00294.

### APPROACHES FOR THE REGULATION OF CRISPR/Cas9 SYSTEM ON THE GUIDE RNA LEVEL

D.S. Novopashina<sup>1\*</sup>, L.V. Sakovina<sup>2</sup>, E.S. Gorlenko<sup>1,2</sup>, E.V. Ivanskaya<sup>2</sup>, O.A. Dolzhikova<sup>1,2</sup>, M.I. Meschaninova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 8

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, str. Pirogova, 2

\*e-mail: danov@niboch.nsc.ru

**Keywords:** regulated CRISPR/Cas9 system, UV-irradiation, allosteric regulation, guide RNA, photocleavable linker, photocaged oligonucleotides.

### ГЕНОМНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЛИНИИ КЛЕТОК CHO 4BGD, ПОЛУЧЕННОЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ СИСТЕМ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ

Н.А. Орлова<sup>1\*</sup>, М.В. Синегубова<sup>1</sup>, Д.Э. Колесов<sup>1</sup>, Ю.А. Ходак<sup>1</sup>, И.И. Воробьев<sup>1</sup>

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН

119071, Москва, проспект 60-летия Октября д. 7 корп. 1

\*e-mail: nobiol@gmail.com

**Ключевые слова:** биоинженерия клеток млекопитающих, CHO, апоптоз, аутофагия, Bak1, Bax, Bcl-2, Beclin-1.



Клетки, геном которых точечно изменен системой CRISPR/Cas, — это перспективная основа продуцентов биофармацевтических белков. В ходе двух раундов редактирования генома клеток китайского хомячка (CHO) мы получили клональную линию CHO 4BGD с нокаутом двух проапоптотических генов *bak1* и *bax*, нокаутом двух генов селекционных маркеров: глутаминсинтазы (*glul*) и дигидрофолатредуктазы (*dhfr*) — и дополнительными копиями генов антиапоптотического белка Bcl-2 и индуктора макроаутофагии Beclin-1 [1,2].

По данным полногеномного секвенирования, все восемь целевых аллелей в геноме клеток 4BGD были успешно разрушены при редактировании, при этом два отредактированных локуса содержали большие вставки нерелевантной ДНК, происходящей из другой хромосомы CHO, из плазмиды, кодирующей нуклеазу Cas9, и из генома *E. coli*. В геноме 4BGD отсутствовали иные вставки ДНК *E. coli*, а все известные гены CHO сохранились в неповрежденном состоянии. Практически не было обнаружено событий нецелевого редактирования генома для всех использованных гидовых РНК.

Клетки 4BGD приобрели желаемый фенотип: они полностью устойчивы к индукции внутреннего пути апоптоза, и пригодны для получения стабильно трансфицированных клеток с селекционным маркером DHFR, и в них эффективно идет амплификация трансгена под воздействием повышающихся концентраций метотрексата. Полученная на основе 4BGD клональная линия-продуцент моноклональных антител живет в режиме культивации с подпиткой на 6 дней дольше, чем аналогичный продуцент на основе интактных клеток CHO S.

Клетки 4BGD не демонстрировали заметного увеличения уровней экспрессии Bcl-2 и Beclin-1 в экспоненциальной фазе роста, однако при их продолжительном культивировании наблюдается сильное повышение уровня экспрессии Bcl-2 и сохранение уровня экспрессии Beclin-1. Уровни экспрессии генов, связанных с индукцией аутофагии и внутреннего пути апоптоза, в клетках 4BGD также значительно отличались от родительских клеток.

Метод, включающий мультиплексное редактирование системой CRISPR/Cas9 и одновременную стабильную трансфекцию плазмидами, кодирующими гены для оверэкспрессии, позволяет получать клетки желаемого фенотипа, не содержащие значимых нецелевых изменений генома, и пригоден для быстрого получения клеток CHO с желаемыми свойствами для биофармацевтических приложений.

#### Литература

- Orlova NA, Dayanova LK, Gayamova EA et al. Targeted knockout of the *dhfr*, *glul*, *bak1*, and *bax* genes by the multiplex genome editing in CHO cells. Dokl Biochem Biophys. 2022;502(1):40–44. (In Russ) doi: 10.1134/S1607672922010082.
- Kovnir SV, Dayanova LK, Gayamova EA et al. Knockout of BAX, BAK1 genes and overexpression of BCL2, BECN1 genes increase lifespan and maximum density of CHO-S cell culture. Biotechnology. 2022;38(4):16–22. (In Russ) doi:10.56304/S0234275822040081.

## GENOMIC AND PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF THE CHO 4BGD CELL LINE OBTAINED AS A RESULT OF GENE EDITING OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGY SYSTEMS

N.A. Orlova<sup>1\*</sup>, M.V. Sinegubova<sup>1</sup>, D.E. Kolesov<sup>1</sup>, Yu.A. Khodak<sup>1</sup>, I.I. Vorobiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Skryabin Institute of Bioengineering Federal Research Center of Biotechnology RAS  
119071, Moscow, prospect 60-letiya Oktyabrya, 7, building 1

\* e-mail: nobiol@gmail.com

**Keywords:** mammalian cell bioengineering, CHO, apoptosis, autophagy, Bak1, Bax, Bcl-2, Beclin-1.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕМОВ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Н.В. Орлова<sup>1\*</sup>, А.Н. Муравьев<sup>1,2</sup>, А.А. Горелова<sup>1,3</sup>, А.Н. Ремезова<sup>1</sup>, А.И. Горбунов<sup>1</sup>, Т.И. Виноградова<sup>1</sup>, Н.М. Юдинцева<sup>4</sup>, Ю.А. Нащекина<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России  
191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

<sup>2</sup> Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»  
195272, Санкт-Петербург, Кондратьевский проспект, д. 72, лит. А

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9

<sup>4</sup> Институт цитологии РАН  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4

\* e-mail: nadinbat@gmail.com

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, аллогенные стволовые клетки, мезенхимные клетки, биодеградируемые полимеры, малый мочевой пузырь, цистопластика.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют огромный интерес для исследователей, благодаря способности дифференцироваться в различные клеточные линии, а также способности оказывать регуляторное воздействие на иммунную систему [1]. МСК используются в составе тканеинженерных конструкций (ТИК) для реконструкции различных урологических структур [2–4].

Цель — экспериментальное замещение различных объемов стенки мочевого пузыря с использованием ТИК.

В качестве матрицы использовались конструкция из поли-L,L-лактида и фиброина шелка, содержащая меченые аллогенные МСК. 36 животным выполнена резекция мочевого пузыря вплоть до субтотальной с замещением его ТИК объемом 5 мл (n=9), 10 мл (n=9), 15 мл (n=9), и 20 мл (n=9).

Через 4, 8, 12 недель после оперативного вмешательства по данным компьютерной томографии органов брюшной полости и малого таза определяется мочевой пузырь физиологической емкости (10–11 мл) во всех группах исследования, имплантированная ТИК визуализируется в виде гиперинтенсивного сигнала в области верхушки мочевого пузыря. Цистометрия наполнения у животных перенесших замещение 20 мл объема мочевого пузыря (субтотальное замещение) показала емкость 11–12 мл, что коррелирует с дооперационными

показателями ( $11,2 \pm 0,97$  мл). Макроскопически зона анастомоза состоятельна во всех группах животных, ТИК определяется в месте имплантации, отмечается лизис конструкции к 12 неделе наблюдения с сохранением небольших остаточных фрагментов в месте имплантации.

Проведенный эксперимент показал возможность субтотального замещения мочевого пузыря кролика ТИК, с сохранением при этом функциональной и анатомической целостности органа. Однако макроскопическое исследование показало, что данного срока наблюдения недостаточно для полного лизиса матрицы, что требует дальнейших исследований и оценки более долгосрочных результатов. Исследование выполняется за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20167, <https://rscf.ru/project/22-25-20167/> и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от «14» апреля 2022 г. № 20/2022).

#### Литература

1. Muraviov AN et al. The use of mesenchymal stem cells in the complex treatment of kidney tuberculosis (experimental study). *Biomedicines* 2022;10:3062. doi: 10.3390/biomedicines10123062.
2. Gorelova A et al. Tissue-engineering technology in urethral reconstruction. *Meditinskii alians*. 2018;3:75–82. (In Russ).
3. Orlova NV et al. Experimental reconstruction of rabbit bladder using allogeneic cells of different tissue origin. *Meditinskii alians*. 2016;1:49–51. (In Russ).
4. Yudintceva NM et al. Experimental bladder regeneration using a poly-lactide/silk fibroin scaffold seeded with nanoparticle-labeled allogenic bone marrow stromal cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:4521. doi: 10.2147/IJN.S111656.

### EXPERIMENTAL TISSUE-ENGINEERED RECONSTRUCTION OF DIFFERENT VOLUMES OF URINARY BLADDER

N.V. Orlova<sup>1</sup>, A.N. Muraviov<sup>1,2</sup>, A. Gorelova<sup>1,3</sup>, A. Remezova<sup>1</sup>, T.I. Vinogradova<sup>1</sup>, A.I. Gorbunov<sup>1</sup>, N.M. Yudintceva<sup>4</sup>, Y.A. Nashchekina<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State Research Institute of Phthiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

191036, Saint-Petersburg, Ligovskii ave., 2-4

<sup>2</sup> Private University «Saint-Petersburg Medico-Social Institute»

195272, St. Petersburg, Kondratievsky ave., 72 lit. A

<sup>3</sup> Saint-Petersburg University

199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya emb., 7-9

<sup>4</sup> Institute of Cytology of the Russian Academy of sciences (RAS)

194064, Saint-Petersburg, Tichoretskii ave, 4

\* e-mail: nadinbat@gmail.com

**Keywords:** tissue-engineering, allogeneic stem cells, mesenchymal stem cells, biodegradable polymers, small bladder, cystoplasty.

### РАЗРАБОТКА ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ AAV ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

М.П. Перепелкина<sup>1,2\*</sup>, А.В. Прокофьев<sup>1,2</sup>, А.В. Фомина<sup>1</sup>, Е.В. Власова<sup>1</sup>, М.А. Васёшенкова<sup>1</sup>, Е.Д. Андреева<sup>1</sup>, М.С. Ребекин<sup>1</sup>, В.А. Маркова<sup>1</sup>, А.Н. Стрелкова<sup>1</sup>, Д.О. Рзаев<sup>1</sup>, Е.В. Юрлова<sup>1</sup>, К.В. Соловьев<sup>1</sup>, М.Н. Рыжкова<sup>1</sup>, В.К. Стуканев, Н.А. Спирина<sup>1</sup>, П.М. Гершович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Биотехнологическая компания BIOCAD, Департамент разработки генотерапевтических препаратов

198515, Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи., д.38, стр.1

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Химико-Фармацевтический Университет

197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

\* e-mail: perepelkinamp@biocad.ru

**Ключевые слова:** генная терапия, гемофилия, аденоассоциированный вирус, FVIII, FIX, rAAV.

Гемофилия А и В — это наследственные заболевания, связанные с нарушением свертываемости крови, вызванные недостаточным количеством в крови пациентов функционально-активного фактора свертываемости 8 (FVIII) или 9 (FIX), соответственно [1]. Различают три степени тяжести заболевания по уровню активности FVIII или FIX в крови: легкая — более 5%, среднетяжелая — от 1% до 5%, тяжелая — ниже 1%. Наиболее распространенным способом лечения гемофилии является заместительная терапия — регулярное введение препаратов рекомбинантных факторов. Пациентам с легкой и среднетяжелой степенью введения рекомбинантных факторов требуется обычно только при травмах, кровотечениях и необходимости хирургических вмешательств. Тяжелая форма гемофилии часто сопровождается рецидивирующими гемартрозами, которые даже на фоне заместительной терапии могут со временем приводить к развитию остеоартроза. Это крайне негативно сказывается на опорно-двигательной динамике пациентов.

Генотерапия гемофилии обеспечивает восстановление уровня целевого фактора свертываемости (более 5%) на 5–10 лет после однократного введения препарата. Нами были разработаны генотерапевтические препараты ANB-002 (лечение гемофилии Б) и ANB-010 (лечение гемофилии А). Принцип их действия заключается в доставке в клетки печени пациента последовательности ДНК, кодирующей функциональный человеческий белок FVIII или FIX при помощи рекомбинантного аденоассоциированного вектора (rAAV). Для увеличения уровня экспрессии FVIII и FIX, кодирующие последовательности были кодированы оптимизированы по алгоритму, разработанному компанией АО «Биокад». Экспрессионная кассета содержит тканеспецифичный промотор, который ограничивает экспрессию трансгена клетками гепатоцитарного происхождения. Также для увеличения экспрессии и секреции в последовательность FVIII и FIX были внесены аминокислотные замены.

Эффективность препаратов ANB-002 и ANB-010 была изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В результате была показана стабильная экспрессия и активность факторов уже на 14 день после инъекции препарата при *in vivo* экспериментах на модельных животных. Более того, данные показатели сохранялись в течение нескольких месяцев после однократного введения генотерапевтического препарата, что приводило к уменьшению длительности и объема кровотечения. Дальнейшие доклинические исследования подтвердили их эффективность и безопасность. Были

получены разрешения Министерства здравоохранения РФ на проведение клинических исследований препаратов ANB-002 и ANB-010.

#### Литература

1. Nathwany AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2022;2022(1):569–578. doi: 10.1182/hematology.2022000388.
2. Samelson-Jones BJ, George LA. Adeno-associated virus gene therapy for hemophilia. *Annu Rev Med*. 2023;74:231–247. doi: 10.1146/annurev-med-043021-033013.

### DEVELOPMENT OF AAV-BASED GENE THERAPY FOR HEMOPHILIA

M.P. Perepelkina<sup>1,2\*</sup>, A.V. Prokofyev<sup>1,2</sup>,  
A.V. Fomina<sup>1</sup>, E.V. Vlasova<sup>1</sup>, M.A. Vaseshenkova<sup>1</sup>,  
E.D. Andreeva<sup>1</sup>, M.S. Rebekina<sup>1</sup>, V.A. Markova<sup>1</sup>,  
A.N. Strelkova<sup>1</sup>, D.O. Rzaev<sup>1</sup>, E.V. Yurlova<sup>1</sup>,  
K.V. Solovyev<sup>1</sup>, M.N. Ryzhkova<sup>1</sup>, V.A. Stukanov,  
N.A. Spirina<sup>1</sup>, P.M. Gershovich<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Biotechnology company BIOCAD, Gene therapy development department*  
198515, Saint Petersburg, Intracity Municipality the Settlement of Strelina, ul. Svyazi, d. 38, str. 1

<sup>2</sup> *The Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University*  
197022, Saint-Petersburg, ul. Pr. Popova, 14, b. A

\*e-mail: perepelkinamp@biocad.ru

**Keywords:** gene therapy, hemophilia, adeno-associated virus, FVIII, FIX, rAAV.

### НОКИН В ГЕНОМ *ARABIDOPSIS THALIANA* ДЛЯ СОЗДАНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Н.В. Пермякова\*, П.А. Белавин, Т.В. Маренкова,  
А.А. Загорская, Ю.В. Сидорчук, Е.А. Уварова,  
В.В. Кузнецов, Е.В. Дейнеко

*Институт цитологии и генетики СО РАН*  
630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** редактирование генов, нокин, *Arabidopsis thaliana*, рекомбинантные белки, суспензионные культуры клеток.

Биопродукция рекомбинантных фармацевтических препаратов в растительных системах экспрессии рассматривается как перспективная альтернатива существующим платформам на основе клеток млекопитающих или бактерий. Культивирование растительных клеток в контролируемых условиях биореакторов обеспечивает продукцию белка высокого качества в соответствии с нормами GMP, а быстрый рост клеток, невысокая стоимость компонентов питательных сред и полное отсутствие риска контаминации вирусами и прионами животного происхождения являются большим преимуществом растительных экспрессионных систем. Несмотря на успешность использования клеточных культур растений для коммерческого получения фармацевтически ценных белков, в этом направлении остается все еще много нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка.

Мы полагаем, что сайт-специфическое встраивание целевых генов в такой район генома, который характеризуется стабильно высоким уровнем экспрессии может решить проблему низкого уровня экспрессии рекомбинантных белков. Нами были проанализированы районы генома характеризующиеся стабильно высоким уровнем экспрессии и была получена серия нокинов в район гена гистона H3.3 *Arabidopsis thaliana*. В ходе работы был подобран оптимальный состав конструкции для сайт-специфического встраивания. Успешная конструкция должна иметь участки гомологии, окружающие сайт разреза в геномной ДНК и дополнительные сайты узнавания эндонуклеазы Cas9, для того чтобы находиться в клетке в момент встраивания в линейной форме. Так же нами были проверены разные способы доставки конструкций для редактирования: биобаллистическая трансформация и агробактериальная трансформация суспензионных культур и агробактериальная доставка методом флорал дип в целые растения. Самую высокую эффективность показала биобаллистическая доставка, однако трудности получения моноклональных линий суспензионных растительных клеток нивелируют это преимущество. Мы полагаем предпочтительным метод флорал дип и последующую инициацию суспензионных культур из растений с подтвержденным нокином. Анализ полученных нокинов показал, что даже при наличии в матрице для нокин участков гомологии с целевым сайтом встраивания трансгенной конструкции не всегда идет по пути гомологичной рекомбинации и в местах соединения растительной и встроившейся трансгенной ДНК могут возникать различные перестройки: инсерции и делеции. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-14-00091.

### KNOCK-IN INTO THE GENOME OF *ARABIDOPSIS THALIANA* TO CREATE A CELL CULTURE PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS

N.V. Permyakova\*, P.A. Belavin, T.V. Marenkova,  
A.A. Zagorskaya, Yu.V. Sidorchuk,  
E.A. Uvarova, V.V. Kuznetsov, E.V. Deineko

*Institute of Cytology and Genetics, SB RAS*  
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10

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

**Keywords:** gene editing, knock-in, *Arabidopsis thaliana*, recombinant proteins, cell suspension cultures.

### ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ, АКТИВИРУЕМЫХ ПЕРОКСИСОМНЫМИ ПРОЛИФЕРАТОРАМИ, В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

М.А. Погосова<sup>1\*</sup>, С.В. Павлова<sup>1</sup>, М.К. Маренина<sup>2</sup>,  
М.Е. Блохин<sup>2</sup>, С.П. Медведев<sup>1</sup>, С.М. Закиян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук*  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук*  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 9

\*e-mail: marypogosova2001@gmail.com

**Ключевые слова:** PPAR рецепторы, сахарный диабет второго типа, дислипидемия.

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (hPPARs), — это семейство ядерных рецепторов, действующих как транскрипционные факторы [1]. Все три типа hPPAR: hPPARA, hPPARG, hPPARD — активируют (или ингибируют) множество генов-мишеней, поэтому их активация (ингибирование) обладает плейотропным эффектом, распространяющимся на все системы организма. Так, под действием различных лигандов hPPARA снижает сердечно-сосудистые осложнения от диабета, уменьшает концентрацию липопротеинов низкой плотности в крови и оказывает противовоспалительный эффект [2], hPPARG и hPPARD повышают чувствительность к инсулину периферических тканей. Активация указанных рецепторов ведет к улучшению состояния при сахарном диабете второго типа, дислипидемии, неалкогольной жировой болезни печени и неалкогольного стеатогепатита, а также при сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях и других патологиях [3, 4]. hPPAR являются перспективными мишенями для лекарственных препаратов. К сожалению, многие из применяемых лекарств обладают побочными эффектами. Сейчас силы исследователей по всему миру направлены на поиск таких лекарственных лигандов, которые не являлись бы токсичными [5].

В ходе работы были синтезированы несколько экспериментальных веществ — потенциальных агонистов hPPARA и hPPARG. В целях изучения активности различных лигандов hPPARA и PPARG в культурах клеток млекопитающих были созданы трансгенные линии на основе клеток хомячка CHO, экспрессирующие рецепторы hPPARA (или hPPARG) а также hRXRA. В трансгенных линиях референсные вещества дозозависимо активируют репортерную конструкцию, содержащую ген люциферазы светлячка под управлением hPPAR связывающих элементов. С помощью полученной тест-системы было проанализировано экспериментальное вещество QS-1148 (в не токсичных концентрациях) которое ингибирует люциферазную активность в репортерной конструкции. Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

#### Литература

- Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPAR-gamma in metabolism, immunity, and cancer: Unified and diverse mechanisms of action. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:624112.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal*. 2010;8:e002.
- Janani C, Ranjitha Kumari B.D. PPAR gamma gene — A review. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(1):46–50.
- Reilly SM, Lee CH. PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett*. 2008; 582(1):26–31.
- Alemán-González-Duhart D, Tamay-Cach F, Álvarez-Almazán S, Mendieta-Wejebe JE. Current advances in the biochemical and physiological aspects of the treatment of type 2 diabetes mellitus with thiazolidinediones. *PPAR Res*. 2016;2016:7614270.

## APPROACHES TO EVALUATION OF ACTIVITY OF PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR AGONISTS IN MAMMALIAN CULTURES

M.A. Pogosova<sup>1\*</sup>, S.V. Pavlova<sup>1</sup>, M.K. Marenina<sup>2</sup>, M.E. Blokhin<sup>2</sup>, S.P. Medvedev<sup>1</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

630090, Novosibirsk, Ac. Lavrentieva ave., 10

<sup>2</sup> N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

630090, Novosibirsk, Ac. Lavrentieva ave., 9

\* e-mail: marypogosova2001@gmail.com

**Keywords:** PPAR receptors, type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia.

## ЭСК МЫШИ, НОКАУТНЫЕ ПО ГЕНАМ СУБЪЕДИНИЦ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ PSMB9 И PSMB10, СОХРАНЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ОСТ4 В РАННЕЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ЭНДОДЕРМАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ

У.И. Поденкова\*, Е.И. Бахмет, А.С. Цимоха

Институт цитологии РАН

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

\* e-mail: uliana.podenkova@gmail.com

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, дифференцировка, убиквитин-протеасомная система, иммунопротеасома.

Всестороннее изучение механизмов поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и их дифференцировки лежит в основе их эффективного и безопасного использования в клеточной терапии и в моделировании различных заболеваний. Известно, что ЭСК обладают способностью противостоять повреждающим факторам, которые могли бы привести к выходу из состояния плюрипотентности и старению. Так, например, показано, что по сравнению с дифференцированными клетками, для ЭСК свойственны повышенная стабильность генома, пониженная частота мутаций. Такие особенности ЭСК обусловлены интенсивным функционированием защитных систем клетки, в том числе за счет поддержания баланса между синтезом и деградацией белков. Большую часть регулируемого протеолиза в клетке осуществляет убиквитин-протеасомная система, протеолитическим ядром которой является протеасома — мультиферментный комплекс, в состав которого входят каталитические субъединицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ . Действие медиаторов воспаления вызывает замену этих субъединиц на индуцибельные  $\beta 1i$ /LMP2,  $\beta 2i$ /MECL1 и  $\beta 5i$ /LMP7, и новообразованный комплекс называют иммунопротеасомой, поскольку для него показано участие в процессе презентации антигена при иммунном ответе в составе молекулы MHC-I. В последние годы появляется множество косвенных свидетельств о возможной роли иммунопротеасом в поддержании плюрипотентности и в дифференцировке.

У ЭСК принято выделять три состояния плюрипотентности относительно приближения клеток

к дифференцировке: раннее (наивные ЭСК), промежуточное и позднее (праймированные ЭСК). При анализе данных РНК-секвенирования было обнаружено, что во время перехода ЭСК мыши в состояние праймированной плюрипотентности повышается экспрессия генов иммуносубъединиц протеасом, что согласуется с полученными нами экспериментальными данными. В данной работе с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов были получены линии ЭСК мыши, дефицитные по генам, кодирующим иммуносубъединицы протеасомы PSMB8, PSMB9 и PSMB10. Мы показали, что данные клеточные линии способны поддерживать плюрипотентное состояние *in vitro*, а также дифференцируются в три зародышевых листка в составе тератом *in vivo*. Вместе с тем, дифференцировка ЭСК, несущих нокаут по генам иммунопротеасомы PSMB9 и PSMB10, в эндодермальном направлении *in vitro* сопровождается экспрессией маркера эндодермальной дифференцировки Foxa2 на фоне продолжающейся экспрессии фактора плюрипотентности Oct4, что может указывать на нарушение способности дифференцироваться в этом направлении *in vitro*. Таким образом, результаты исследования позволяют предположить, что функционирование иммунопротеасом играет важную роль на ранних стадиях дифференцировки. Работа поддержана грантом РФ (22-14-00390).

#### MOUSE ESC DEFICIENT IN GENES OF IMMUNOPROTEASOME SUBUNITS PSMB9 AND PSMB10 KEEP OCT4 EXPRESSION IN EARLY ENDODERMAL DIFFERENTIATION

U.I. Podenkova\*, E.I. Bakhmet, A.S. Tsimokha

*Institute of Cytology RAS  
194064, St.Petersburg, Tikhoretsky avenue, 4*

\*e-mail: uliana.podenkova@gmail.com

**Keywords:** embryonic stem cells, pluripotency, differentiation, ubiquitin-proteasome system, immunoproteasome.

#### РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.В. Прокофьев<sup>1,2\*</sup>, А.Н. Стрелкова<sup>1</sup>, Д.О. Рзаев<sup>1</sup>, В.К. Стуканёв<sup>1</sup>, Е.В. Юрлова<sup>1</sup>, К.В. Соловьев<sup>1</sup>, А.А. Оленев<sup>1</sup>, М.Н. Рыжкова<sup>1</sup>, П.М. Гершович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Биотехнологическая компания BIOCAD,  
Департамент разработки генотерапевтических препаратов  
198515, Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи., 34-А

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Химико-Фармацевтический  
Университет  
197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

\*e-mail: prokofevav@biocad.ru

**Ключевые слова:** иммунотерапия, онколитические вирусы, энтеровирусы.

Онколитические вирусы — класс экспериментальных биологических противоопухолевых препаратов, которые избирательно реплицируются в раковых клетках, разрушая их, но не наносят вреда нормальным клеткам. Онколитические вирусы являются высокоэффективным

инструментом для борьбы с агрессивными опухолями [1]. Одним из перспективных типов вирусов, которые могут быть использованы в качестве онколитических являются энтеровирусы [2, 3]. Преимуществом энтеровирусов является возможность системного применения, что значительно расширяет возможности применения препарата на их основе в лечении широкого спектра онкологических заболеваний.

На данный момент в компании BIOCAD ведутся работы по получению полностью охарактеризованных синтетических рекомбинантных онколитических энтеровирусов с заданными свойствами, обладающих улучшенным профилем эффективности и безопасности. Так нами была разработана технология получения онколитических энтеровирусов *de novo* и получены лоты полностью охарактеризованных онколитических энтеровирусов для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*. Также нами были разработаны технологии наработки и очистки, а также необходимые аналитические методики, позволяющие получать полностью охарактеризованные высокоочищенные препараты синтетических онколитических энтеровирусов.

Результаты проведенных нами *in vitro* исследований показали, что полученные нами синтетические онколитические варианты энтеровирусов вызывают цитопатическое действие на целевые опухолевые клетки, не оказывая при этом токсического действия на клетки не онкогенного происхождения. Кроме того, проведенные нами пилотные *in vivo* исследования на различных животных моделях показывают безопасность и высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность разработанных нами препаратов.

Разрабатываемый в компании BIOCAD препарат будет представлять собой модифицированные синтетические онколитические энтеровирусы для применения в формате монотерапии либо в комбинации с иммунотерапевтическими и химиотерапевтическими препаратами и предназначен для лечения широкого спектра онкологических заболеваний.

#### Литература

- Shalhout SZ, Miller DM, Emerick KS, Kaufman HL. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(3):160–177.
- Annels NE, Mansfield D, Arif M et al. Phase I trial of an ICAM-1-targeted immunotherapeutic-coxsackievirus A21 (CVA21) as an oncolytic agent against non muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(19):5818–5831.
- Dighe OR, Korde P, Bisen YT et al. Emerging recombinant oncolytic poliovirus therapies against malignant glioma: A review. *Cureus.* 2023;15(1):e34028.

#### DEVELOPMENT OF NEW IMMUNOTHERAPY BASED ON ONCOLYTIC ENTEROVIRUSES

А.В. Прокофьев<sup>1,2\*</sup>, А.Н. Стрелкова<sup>1</sup>, Д.О. Рзаев<sup>1</sup>, В.К. Стуканёв<sup>1</sup>, Е.В. Юрлова<sup>1</sup>, К.В. Соловьев<sup>1</sup>, А.А. Оленев<sup>1</sup>, М.Н. Рыжкова<sup>1</sup>, П.М. Гершович<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology company BIOCAD, Gene therapy development department  
198515, Saint-Petersburg, Strelina, Svyazi st., 34-A

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University  
197022, Saint-Petersburg, Professor Popov str., 14-A

\*e-mail: prokofevav@biocad.ru

**Keywords:** immunotherapy, oncolytic viruses, enteroviruses.

## РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА *p.Asn515del* В ГЕНЕ *MYBPC3* В ФОРМИРОВАНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА КАРДИОМИОЦИТОВ *IN VITRO*

К.А. Проняева<sup>1,2\*</sup>, С.В. Павлова<sup>1</sup>,  
С.М. Закиян<sup>1</sup>, Е.В. Дементьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\*e-mail: ks\_pronyaeva@mail.ru

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR/Cas9, кардиомиоциты, гипертрофическая кардиомиопатия, клиническое значение варианта.

Дифференциальная диагностика некоторых заболеваний до сих пор вызывает разногласия в медицинской среде. Такие заболевания, как наследственная гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), болезнь Фабри, болезнь Данона, амилоидоз, при стертом течении имеют схожую клиническую картину. Обладая полным представлением о генетической основе тех или иных заболеваний, существенно упрощается их диагностика.

Целью данного исследования является установление влияния генетического варианта с неясным клиническим значением *p.Asn515del* в гене *MYBPC3* на развитие патологического фенотипа ГКМП кардиомиоцитов *in vitro* с использованием технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и системы CRISPR/Cas9. С помощью рибонуклеопротеиновых комплексов системы CRISPR/Cas9 и донорной последовательности, содержащей делецию *p.Asn515del*, данный генетический вариант был внесен в ген *MYBPC3* ИПСК условно здорового пациента линии K7 (ICGiO22-A). В результате, были получены три линии ИПСК, гомозиготные по делеции *p.Asn515del*, которые сохраняли свои плюрипотентные свойства и нормальный кариотип. Для исправления мутации в ранее полученные ИПСК пациента с генетическим вариантом *p.Asn515del* в гене *MYBPC3* были внесены рибонуклеопротеиновые комплексы системы CRISPR/Cas9 и донорная последовательность дикого типа. Три линии ИПСК с внесённой делецией K7-N515del, линии ИПСК пациента, линия ИПСК изогенного контроля K7 и линии ИПСК условно здоровых пациентов K6 (ICGiO21-A) и K9 были подвергнуты кардиальной дифференцировке. Спустя 34–36 дней дифференцировки клетки окрашивались антителами к маркерам кардиомиоцитов, после чего сравнивались их площади. По полученным данным, кардиомиоциты пациента и кардиомиоциты с внесённой делецией воспроизводили один из характерных признаков ГКМП и имели достоверно большую площадь, чем кардиомиоциты кардиально здоровых пациентов, включая изогенный контроль. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00271.

## THE ROLE OF THE *p.Asn515del* GENETIC VARIANT IN THE *MYBPC3* GENE IN THE FORMATION OF THE PATHOLOGICAL PHENOTYPE OF CARDIOMYOCYTES *IN VITRO*

K.A. Pronyaeva<sup>1,2\*</sup>, S.V. Pavlova<sup>1</sup>,  
S.M. Zakian<sup>1</sup>, E.V. Demytyeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and  
Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University  
630090, Novosibirsk, Pirogova, 1

\*e-mail: ks\_pronyaeva@mail.ru

**Keywords:** induced pluripotent stem cells, CRISPR/Cas9, cardiomyocytes, hypertrophic cardiomyopathy, clinical significance of variants.

## НОВЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ШАПЕРОНЫ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ — ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

С.Н. Пчелина<sup>1,2\*</sup>, А.Э. Копытова<sup>1,2</sup>,  
Г.Н. Рычков<sup>1</sup>, Ф.М. Ибатуллин<sup>1</sup>,  
Е.В. Григорьева<sup>3</sup>, М.А. Николаев<sup>1,2</sup>,  
А.Д. Изюмченко<sup>1,2</sup>, Г.В. Байдакова<sup>4</sup>,  
С.В. Павлова<sup>3</sup>, Е.С. Яркова<sup>3</sup>, Д.А. Сорогина<sup>3</sup>,  
Е.Ю. Захарова<sup>4</sup>, А.К. Емельянов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики имени  
НИИЦ Б.П. Константинова «Курчатовский институт»  
188300, Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный  
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 10

<sup>4</sup> Медико-генетический научный центр  
115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

\*e-mail: sopchelina@hotmail.com

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, фармакологические шапероны, глюкоцереброзидаза, *GBA1*, макрофаги, дофаминергические нейроны.

Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к развитию болезни Гоше (БГ) и являются фактором высокого риска болезни Паркинсона (БП). В зависимости от популяции мутации в гене *GBA1* выявляются от 10 до 30% пациентов с БП. Большинство мутаций *GBA1* не затрагивают активный сайт фермента, но нарушают его конформацию и транспорт к сайту действия в лизосомы, что приводит к снижению активности GCase и накоплению концентрации лизосфинголипидов, часто оцениваемых как накопление гексозилсфингозина HexSph. Для увеличения активности фермента предлагается использованием фармакологических шаперонов (ФШ) GCase, малых молекул, способствующих сборке фермента и его транспорту в лизосомы. Сегодня наиболее перспективными ФШ GCase являются амброксол и соединение NCGCO0241607 (NO7) [1].

Нами разработана полноатомная модель GCase, с помощью молекулярного докинга (Molsoft ICM pro3.8) и молекулярной динамики (Amber18) нами

показаны сайты связывания амброксола и соединения NO7 с ферментом [2,3], а также предложено новое соединение N2, производная соединения NO7, обладающая большей растворимостью с аналогичной константой связывания. Предложена оригинальная система скрининга эффективности ФШ GCCase in vitro на первичной культуре макрофагов и дофаминергических (ДА) нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных из мононуклеаров пациентов с мутациями гена *GBA1* (мутация N370S) с последующей оценкой активности фермента и накопления субстрата методом ВЭЖХ-МС/МС.

Нами сопоставлена эффективность синтезированного нами соединения N2 с ФШ GCCase амброксомом и NO7 и показано, что N2 показало большую эффективность в снижении концентрации лизосфинголипидов и увеличении эффективности транслокации GCCase в лизосомы (степень колокализации GCCase с LAMP2).

В настоящее время нами с целью репозиционирования лекарственных средств проводится скрининг in silico зарегистрированных препаратов по их способности связываться с GCCase. Предполагается, что подобный подход будет способствовать ускорению появления таргетной терапии БП в клинике. Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-25-00721.

#### Литература

1. Patent USA. US2015065469A1/ O5.03.2015. Aflaki E. et al. Salicylic acid derivatives useful as glucocerebrosidase activators. Available from: <https://patents.google.com/patent/US20150065469A1/en?q=US+2015%2f0065469+A1> (In Eng).
2. Kopytova AE et al. Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCCase) activity and restores GCCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2021;84:112–121.
3. Kopytova AE et al. Potential binding sites of pharmacological chaperone NCGCO0241607 on mutant  $\beta$ -glucocerebrosidase and its efficacy on patient-derived cell cultures in Gaucher and Parkinson's disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10):9105.

### NEW PHARMACOLOGICAL CHAPERONES OF GLUCOCEREBROSIDASE — TARGETED TREATMENT FOR PARKINSON'S DISEASE

S.N. Pchelina<sup>1,2\*</sup>, A.E. Kopytova<sup>1,2</sup>, G.N. Rychkov<sup>1</sup>, F.M. Ibatullin<sup>1</sup>, E.V. Grigor'eva<sup>3</sup>, M.A. Nikolaev<sup>1,2</sup>, A.D. Izyumchenko<sup>1,2</sup>, G.V. Baydakova<sup>4</sup>, S.V. Pavlova<sup>3</sup>, E.S. Yarkova<sup>3</sup>, D.A. Sorogina<sup>3</sup>, E.Yu. Zakharova<sup>4</sup>, A.K. Emelyanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute»

188300, Gatchina, 1, mkr. Orlova roshcha

<sup>2</sup> Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University

197022, Saint-Petersburg, L'va Tolstogo str. 6-8

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

630090, Novosibirsk, 10, Ac. Lavrentieva ave.

<sup>4</sup> Research Centre for Medical Genetics

115522, Moscow, Moskvorechye St., 9

\* e-mail: sopcelina@hotmail.com

**Keywords:** Parkinson's disease, pharmacological chaperones, glucocerebrosidase, *GBA1*, macrophages, dopaminergic neurons.

### НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ: ПРИМЕНЕНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕДКИХ (ОРФАННЫХ) НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Ризванов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Гриволжский) федеральный университет, 420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

\* e-mail: rizvanov@gmail.com

**Ключевые слова:** генная терапия, орфанные заболевания, аденоассоциированные вирусы.

Генная терапия — это динамично развивающаяся область современной биомедицины, представляющая перспективное направление для лечения широкого спектра заболеваний, включая наследственные. Такие заболевания, зачастую вызванные мутациями одного гена, значительно ухудшают качество жизни пациентов и зачастую лишены эффективных методов лечения.

Адено-ассоциированные вирусы (AAV) в настоящее время рассматриваются как один из многообещающих векторов для генной терапии. Они характеризуются низкой патогенностью для человека, минимальной иммуногенностью и способностью обеспечивать долговременную экспрессию трансгенов. Это особенно важно для наследственных заболеваний, требующих постоянной генетической коррекции на протяжении всей жизни пациента. Несмотря на неудачный коммерческий опыт с препаратом Глибера, основанным на AAV1, для лечения наследственного дефицита липопропротеинлипазы, и скромные результаты Лукстурна, использующего AAV2 для лечения наследственной дистрофии сетчатки, генная терапия получила второе дыхание благодаря успеху препарата Золгенсма. Этот препарат, основанный на AAV9, предназначен для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА), став блокбастером и в течение длительного времени оставался самым дорогостоящим лекарственным средством в мире.

Однако 2022 год открыл новые перспективы с появлением препаратов Хемгеникс и Роктавиан, разработанных на базе AAV5 для лечения гемофилии В и тяжелой формы гемофилии А соответственно. Эти инновационные продукты не только установили новые рекорды по стоимости, но и расширили горизонты лечения для пациентов с тяжелыми наследственными заболеваниями.

Казанский федеральный университет активно вовлечен в исследования и разработку лекарственных препаратов для различных наследственных заболеваний, включая метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Тея-Сакса, СМА, гемофилию, мукополисахаридоз и другие. Сотрудничество с ведущими отечественными фармацевтическими компаниями открывает путь к практическому внедрению подобных разработок в клиническую практику. Однако высокие затраты на GMP-производство и ограниченное количество пациентов представляют препятствие для коммерческих проектов. Возможным решением для многих пациентов было бы разрешение на использование «академических» препаратов на основе AAV для индивидуального лечения, когда другие варианты терапии недоступны. Работа выполнена при финансовой поддержке госзадания 0671-2020-0058 Министерства науки и высшего образования РФ.

## NEW HORIZONS: APPLICATION OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES IN GENE THERAPY FOR THE TREATMENT OF RARE (ORPHAN) HEREDITARY DISEASES

A.A. Rizvanov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University,  
18, Kremlevskaya St., Kazan, 420008, Russia.

\*e-mail: rizvanov@gmail.com

**Keywords:** gene therapy, orphan diseases, adeno-associated viruses.

## ENHANCING mtDNA EDITING EFFICIENCY THROUGH OPTIMIZED CRISPR-Cas12a SYSTEM

B. Rimskaya

Ph.D. Education Programme, Moscow Institute of Physics and Technology  
141700, Dolgoprudny, Institutskiy Lane 9  
Skolkovo Institute of Science and Technology  
121205, Moscow, Bolshoy Boulevard 30, bld. 1

e-mail: B.Rimskaya@skoltech.ru

**Keywords:** CRISPR-Cas12a, mtDNA editing, mitochondrial deletions, RNA import, inherited diseases, *MGME1* knockdown.

Mitochondrial disorders associated with mitochondrial genome (mtDNA) mutations present a severe clinical phenotype, posing a challenge for editing mtDNA due to limitations in importing CRISPR-Cas system components across mitochondrial membranes.

In our study, we propose a novel approach to editing mtDNA by introducing deletions using a modified CRISPR-Cas12a system. Our primary objective was to effectively suppress the mtDNA degradation system in the HEK293T cell line by knocking down *MGME1* gene, an endonuclease responsible for degrading damaged mtDNA with double-strand breaks. We tested several transgenic plasmids for lentiviral particle assembly and small hairpin RNAs (shRNAs), resulting in an increased efficiency of *MGME1* knockdown from 30–40% to 80% and above (final Multiplicity of Infection (MOI) = 5). Additionally, we constructed a lentiviral vector containing the Su9-AsCas12a nuclease with a mitochondrial import signal. Subsequently, both vectors were integrated into a unified system to enable simultaneous expression of shRNA targeting *MGME1* and the Su9-AsCas12a nuclease. Cas12a nuclease colocalization with mitochondria was confirmed through immunocytochemical analysis. To facilitate the import of crRNAs into mitochondria, we developed and synthesized chemically modified crRNAs with lipophilic moieties such as cholesterol, berberine, triphenylphosphonium, or rhodamine. The underlying mechanism relies on the attachment of lipophilic moieties, facilitating the diffusion of hydrophilic nucleic acids across cellular membranes.

Moreover, our forthcoming investigations aim to elucidate the intricate mechanism underlying mtDNA repair in the presence of sticky ends and the consequent formation of deletions. We intend to achieve this by employing targeted amplification of the specific mtDNA region and conducting fragment-based PCR analysis. Our ultimate objective is to develop an innovative system capable of modulating the level of heteroplasmy in hereditary disorders associated with mtDNA mutations. The work

was supported by the Russian Science Foundation (No. 23-45-10010).

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ГЕНА XIAP НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Р.Р. Савченко<sup>1\*</sup>, Т.Н. Киреева<sup>1</sup>, Д.И. Жигалина<sup>1</sup>, А.С. Дюма<sup>2</sup>, Г.А. Степанов<sup>2</sup>, М.Е. Меняйло<sup>3</sup>, А.А. Фролова<sup>3</sup>, Н.А. Скрыбин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ РАН  
634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8  
<sup>3</sup> НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН  
634009, Томск, пер. Кооперативный, 5

\*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

**Ключевые слова:** болезнь Вильсона-Коновалова, *АТР7В*, клиническая гетерогенность, гены-модификаторы, *XIAP*, CRISPR/Cas9, цитотоксичность.

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) — хроническое прогрессирующее заболевание, обусловленное мутациями в гене *АТР7В* и приводящее к нарушению метаболизма меди с избыточным накоплением ее в висцеральных органах и центральной нервной системе [1]. Для БВК характерен выраженный клинический полиморфизм, касающийся как спектра и тяжести симптомов, так и возраста манифестации заболевания, что указывает на то, что в патогенез данного состояния могут быть вовлечены и другие гены [2]. Предположительно, одним из генов-модификаторов может выступать *XIAP*, кодирующий ингибитор апоптоза. Показано, что нокаут *Xiap* приводит к снижению содержания меди в тканях мышцы [3]. В связи с этим целью данного исследования заключалась в изучении роли гена *XIAP* в качестве потенциального модификатора при БВК. Для этого с использованием клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 были созданы две модельные клеточные линии с нокаутом *АТР7В* и одновременным нокаутом *АТР7В* и *XIAP*. Полученные клеточные линии были использованы для оценки цитотоксичности после обработки медью с помощью МТТ-теста. Показано, что после 24-часового воздействия  $\text{CuSO}_4$  в дозах 640 и 1280  $\mu\text{M}$  выживаемость клеточной линии HepG2 с нокаутом *АТР7В* статистически значимо снижалась до  $51,3 \pm 0,10$  и  $16,2 \pm 0,11\%$ , соответственно, по сравнению с контрольной клеточной линией HepG2 ( $73,0 \pm 0,11$  и  $35,8 \pm 0,12\%$ ). При этом дополнительный нокаут гена *XIAP* приводил к статистически значимому возрастанию выживаемости ( $60,7 \pm 0,09$  и  $42,5 \pm 0,09\%$ , соответственно) по сравнению с клеточной линией с нокаутом *АТР7В*. Более того, выживаемость клеточной линии с одновременным нокаутом *АТР7В* и *XIAP* при воздействии в дозе 1280  $\mu\text{M}$  ( $42,5 \pm 0,09\%$ ) превышала таковую в контрольной клеточной линии HepG2 ( $35,8 \pm 0,12\%$ ,  $p < 0,05$ ). Таким образом, согласно результатам данной работы, дополнительный нокаут гена *XIAP* в клеточной линии HepG2 с нокаутом *АТР7В* способствует лучшей выживаемости клеток после обработки медью, что указывает на возможную роль гена *XIAP* в качестве модификатора при БВК.



**Литература**

1. Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P et al. Wilson disease. *Nature*. 2018;4(1):21.
2. Medici V, Weiss KH. Genetic and environmental modifiers of Wilson disease. *Handbook of clinical neurology*. 2017;142:35–41.
3. Burstein E, Ganesh L, Dick RD et al. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of *MURR1*. *EMBO J*. 2004;23(1):244–254.

**STUDY OF THE MODIFYING EFFECT OF THE XIAP GENE ON CELL SURVIVAL IN WILSON DISEASE**

R.R. Savchenko<sup>1\*</sup>, T.N. Kireeva<sup>1</sup>, D.I. Zhigalia<sup>1</sup>,  
A.S. Dome<sup>2</sup>, G.A. Stepanov<sup>2</sup>, M.E. Menyailo<sup>3</sup>,  
A.A. Frolova<sup>3</sup>, N.A. Skryabin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, RAS*  
634050, Tomsk, 10 Nab. Ushaiki str.

<sup>2</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS*  
630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Avenue

<sup>3</sup> *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS*  
634009, Tomsk, 5 Kooperativny Street

\*e-mail: renata.savchenko@medgenetics.ru

**Keywords:** Wilson disease, *ATP7B*, clinical heterogeneity, modifier genes, XIAP, CRISPR/Cas9, cytotoxicity.

**ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗИ МЕЖДУ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРОЙ ХРОМАТИНА И ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ: АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ МЫШИНОГО ЛОКУСА *Slc29a3/Unc5b***

П.А. Сальников<sup>1,2\*</sup>, А.П. Ян<sup>1,2</sup>, П.С. Белокопытова<sup>1,2</sup>,  
Э. Весна<sup>1,2</sup>, Н.Ю. Торгунаков<sup>1,2</sup>,  
Я.К. Степанчук<sup>1,2</sup>, С.А. Тихомиров<sup>1</sup>,  
В.А. Лукьянчикова<sup>1,2</sup>, В.С. Фишман<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Новосибирский государственный университет*  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>2</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН*  
630090, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10

\*e-mail: p.salnikov@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, редактирование генома, пространственная организация хроматина, регуляция экспрессии генов.

С точки зрения пространственной организации интерфазный хроматин разделен на Топологически-Ассоциированные Домены (ТАДы) [1]. Транскрипционный фактор CTCF образует границы ТАДов, контролируя взаимодействия цис-регуляторных элементов. Нарушения этих границ могут вызывать врожденные патологии человека [2]. Даже при активных исследованиях данные о важности границ ТАДов противоречивы, и не все изменения вызывают заметные фенотипические аномалии [3]. Изучение пространственной организации на конкретных локусах помогает развить модели для интерпретации клинических вариантов.

Локус генома мыши *Slc29a3/Unc5b* содержит сильную границу ТАДов, инсулирующую домены с витальными генами. С применением технологии CRISPR/Cas9 мы создали модельную линию мышей на основе линии C57Bl/6 с удаленным кластером связывания CTCF на границе этих ТАДов. Исследование

аллель-специфичной экспрессии генов в гибридах с *Mus musculus castaneus* позволило сравнить уровни экспрессии мутантного и исходного аллелей.

Изменения в экспрессии были замечены менее, чем в половине тканей, и в большинстве случаев не превышали 25%. Для генов *Slc29a3* и *Vsir* замечены разнонаправленные изменения в разных органах, что подтверждает гипотезу о тканеспецифичности роли ТАДов в регуляции генной экспрессии. Наибольшие изменения наблюдаются в экспрессии тканеспецифичных генов *Unc5b* и *Cdh23*, что подтверждает гипотезу о значительном участии ТАДов в регуляции генов развития.

Кроме того, мы наблюдали корреляцию в изменении экспрессии генов *Slc29a3*, *Vsir* и *Sgpl1* при перестройке ТАДов. Эти гены, находящиеся у основания петель ТАДов, сближаются в трехмерном пространстве, независимо от их геномного расстояния. Ранее воздействие перестройки ТАДов на гены в основаниях петель не было подробно изучено.

Наконец, наши результаты показывают, что взаимодействие между 3D-структурой хроматина и регуляцией генной экспрессии определяется клеточным типом и локальным состоянием хроматина. Исследование взаимосвязей между генной экспрессией и структурой ТАДов важно для прогнозирования последствий мутаций человека, приводящих к изменению пространственной организации хроматина.

**Литература**

1. Rao SS, Huntley MH, Durand NC et al. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 2014;159(7):1665–1680.
2. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015;161:1012–1025.
3. Franke M, Ibrahim DM, Andrey G et al. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature*. 2016;538:265–269.

**TISSUE-SPECIFIC RELATIONSHIP BETWEEN SPATIAL CHROMATIN STRUCTURE AND GENE EXPRESSION: ANALYSIS OF MOUSE LOCUS *Slc29a3/Unc5b***

P.A. Salnikov<sup>1,2\*</sup>, A.P. Yan<sup>1,2</sup>, P.S. Belokopytova<sup>1,2</sup>,  
E. Vesna<sup>1,2</sup>, N.Yu. Torgunakov<sup>1,2</sup>,  
Y.K. Stepanchuk<sup>1,2</sup>, S.A. Tikhomirov<sup>1</sup>,  
V.A. Lukyanchikova<sup>1,2</sup>, V.S. Fishman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Novosibirsk State University*  
630090, Novosibirsk, Pirogova St, 2

<sup>2</sup> *Institute of Cytology and Genetics SB RAS*  
630090, Novosibirsk, Lavrentyev Ave, 10

\*e-mail: p.salnikov@g.nsu.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9, genome editing, spatial organization of chromatin, regulation of gene expression.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ГЕТЕРОКОМПЛЕКСА 5-НТ<sub>7</sub>-Trkb IN VITRO**

С.А. Самарина<sup>1,2\*</sup>, А.С. Цыбко<sup>2</sup>,  
В.С. Науменко<sup>2</sup>, Т.В. Ильчибаева<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН*  
630090, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10

\*e-mail: s.samarina@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** 5-HT<sub>7</sub>-рецептор, TrkB-рецептор, серотониновая система.

5-HT<sub>7</sub>-рецептор — последний из открытых подтипов серотониновых рецепторов. Он регулирует физиологические функции в норме и при развитии нейropsychических расстройств. TrkB — тирозинкиназный рецептор B, специфичный для нейротрофического фактора мозга (BDNF), опосредует функции обучения, памяти, движения. Известно, что 5-HT<sub>7</sub>-рецептор способен образовывать комплексы как с различными белками (серотониновыми рецепторами других подтипов, киназой CDK5 [1], гликопротеином CD44 [2]). Кроме того, показано повышение фосфорилирования TrkB при активации 5-HT<sub>7</sub> in vitro [3]. Также с помощью методов ко-иммунопреципитации, FRET, PLA показано образование комплексов TrkB-5-HT<sub>7A</sub> [4]. Ранее мы показали наличие комплексов 5-HT<sub>7</sub>-TrkB в ряде структур головного мозга мыши, обнаружили повышение фосфорилирования TrkB в ответ на активацию 5-HT<sub>7</sub>. На основе всего вышесказанного целью нашей работы стало определение функциональной значимости комплексов 5-HT<sub>7</sub>-TrkB in vitro.

Исследование проводилось на клеточной линии N1E-115, трансфицируемой плазмидами, несущими гены *Htr7*, *Ntrk2* по отдельности и совместно. Оценивался уровень фосфорилирования TrkB-рецептора и его вторичного мессенджера MAPK в ответ на активацию рецепторов.

Было показано, что уровень фосфорилирования TrkB повышается при активации агонистом по сравнению с контролем при трансфекции плазмидой с геном *Ntrk2* ( $p = 0,043$ ), но не при котрансфекции с *Htr7*-содержащей плазмидой ( $p = 0,46$ ), однако в обоих случаях повысился уровень фосфорилирования MAPK ( $p < 0,0001$  в обоих случаях). Такой результат может говорить о блокировке активации TrkB в присутствии 5-HT<sub>7</sub>. Обработка агонистом 5-HT<sub>7</sub> рецепторов LP-211 не повлияла на фосфорилирование TrkB в отсутствие 5-HT<sub>7</sub>, но понизила уровень фосфорилирования при котрансфекции по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,0131$ ). Уровень фосфорилирования MAPK при воздействии LP-211 не менялся.

Таким образом, нами впервые было показано влияние активации рецепторов, входящих в гетероконплекс 5-HT<sub>7</sub>-TrkB, на внутриклеточные каскады TrkB-рецептора in vitro в присутствии в клетке обоих или одного из рецепторов. Исследование было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

#### Литература

1. Labus J, Röhrs KF, Ackmann J et al. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor. *Prog Neurobiol.* 2021;197:101900.
2. Bijata M, Bączyńska E, Müller FE et al. Activation of the 5-HT7 receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Rep.* 2022;38(11):110532.
3. Samarajeewa A, Goldemann L, Vasefi MS et al. 5-HT7 receptor activation promotes an increase in TrkB receptor expression and phosphorylation. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:391.
4. Ilchibaeva T, Tsybko A, Zeug A et al. Serotonin receptor 5-HT2A regulates TrkB receptor function in heteroreceptor complexes. *Cells.* 2022;11(15):2384.

## INVESTIGATION OF THE 5-HT7-TrkB HETEROMERIZATION FUNCTIONAL ROLE IN VITRO

S.A. Samarina<sup>1,2\*</sup>, T.V. Ilchibaeva<sup>2</sup>,  
A.S. Tsybko<sup>2</sup>, V.S. Naumenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogova st., 1

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentieva ave., 10

\* e-mail: s.samarina@g.nsu.ru

**Keywords:** 5-HT<sub>7</sub> receptor, TrkB receptor, serotonergic system.

## ОСОБЕННОСТИ АРТЕРИОГЕНЕЗА ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Л.Е. Сдобникова<sup>1</sup>, И.А. Чекмарева<sup>1</sup>, А.В. Ревещин<sup>2</sup>,  
Г.В. Павлова<sup>2</sup>, С.В. Сдобникова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Медицинский научно-образовательный центр МГУ  
им. М.В. Ломоносова  
119192, Москва, Ломоносовский пр., 27, к. 10

<sup>2</sup> Институт высшей нервной деятельности  
и нейрофизиологии РАН  
117485, Москва, ул. Бултерова, 5а

\* e-mail: sдобnikova\_sv@mail.ru

**Ключевые слова:** диабетическая ретинопатия, ангиогенез, артериогенез.

Возможности офтальмоскопии позволяют прижизненно изучать новообразованные сосуды (НС) при пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) вследствие: 1. прозрачности сред, 2. легкости дифференцировки НС в результате их экстраретинального роста; 3. возможности изучения удаленных в ходе операций НС. Несмотря на важность изучения неоангиогенеза при ПДР, систематизированного исследования НС предпринято не было, что может быть объяснено сложностью получения клинического материала и отсутствием экспериментальной модели. Тем не менее общепризнанно, что НС при ПДР берут начало от венул.

Наше ангиографическое и патоморфологическое исследования, выполненные с 1997 по 2019 годы, показали, что в жизненном цикле НС основную роль играет наличие или отсутствие их перфузии кровью. Характеристикой, определяющей направление эволюции ПДР: прогрессирование, стабилизация или регресс, — является наличие коммуникации эпицентров ангиогенеза (ЭА) с ретинальными артериолами.

На всех стадиях развития ЭА демонстрируют воспроизводимую конструкцию. Ее архитектура уникальна. На развитых стадиях в ЭА выявлены все отделы, присущие классической системе региональной гемоциркуляции. НС при ПДР развиваются таким образом, что ее «зона роста» постепенно мигрирует от точки вставания ЭА. Следствием подобного механизма является формирование зональной конструкции сосудистой системы. При ультраструктурном и иммуногистохимическом исследованиях во всех случаях были выявлены НС, имеющие строение типичное для артерий.

Таким образом, при прогрессировании ПДР гемодинамический фактор является определяющим, в его основе лежит наличие коммуникации ЭА с ретинальными артериолами. Результатом этой коммуникации является

преобразование новообразованных экстраретинальных капилляров в артериальные сосуды. В настоящем исследовании впервые представлено патоморфологическое доказательство возможности ангиогенеза при ПДР de novo.

### FEATURES OF ARTERIOGENESIS IN DIABETIC RETINOPATHY

L.E. Sdobnikova<sup>1</sup>, I.A. Chekmareva<sup>1</sup>, A.V. Revishchin<sup>2</sup>, G.V. Pavlova<sup>2</sup>, S.V. Sdobnikova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Medical Scientific and Educational Center of Lomonosov Moscow State University  
119192, Moscow, Lomonosovskiy Pr., 27, k. 10

<sup>2</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences  
117485, Moscow, 5a Butlerova str.

\*e-mail: sdobnikova\_sv@mail.ru

**Keywords:** diabetic retinopathy, angiogenesis, arteriogenesis.

### ИНСТРУМЕНТЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ГЕНОМА ХЛОРОПЛАСТОВ

Ю.В. Сидорчук<sup>1\*</sup>, П.А. Белавин<sup>1</sup>, Е.С. Хайрулина<sup>1</sup>, Д.Е. Самодуров<sup>1</sup>, Е.В. Дейнеко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** хлоропласты, пластом, редактирование генома, трансформация, транспластомные растения.

Создание транспластомных растений является перспективной альтернативой трансформации ядерного генома. Большое число копий генома хлоропластов, достигающее, например, у табака 10000 на клетку, может обеспечивать высокий уровень наработки целевых рекомбинантных белков, до 40–60% от ОРБ. У ядерных трансформантов данный показатель редко превышает 1%. Интеграция трансгена в хлоропластный геном по принципу гомологичной рекомбинации снимает вопрос эффекта положения, а материнский тип наследования трансгена решает проблему экологической безопасности. Одной из самых важных проблем при получении транспластомных растений является крайне низкий выход трансформантов даже при работе с модельными объектами. Используя технологии редактирования можно повысить частоту трансформации генома хлоропластов до 6–10 раз за счёт увеличения частоты двунитевых разрывов [1]. На сегодняшний день показаны примеры редактирования внеядерных геномов растений с помощью нуклеаз типа «цинковые пальцы», TALEN и CRISPR/Cas9 [2].

В лаборатории модификации пластидного генома высших растений на основе системы CRISPR/Cas9 разрабатывается система повышения количества двунитевых разрывов в пластоме табака. Для этой цели созданы ядерные трансформанты табака *N. tabacum*, экспрессирующие ген эндонуклеазы Cas9 под управлением 35S промотора, слитый с последовательностью, кодирующей сигнал хлоропластной локализации малой субъединицы РБФК А. *thaliana* [3].

Направляющая РНК и кассета экспрессии, включающая репортерный ген *gfp* и доминантный селективный маркер *aadA*, будут доставляться в хлоропласты посредством биобаллистики. Направляющая РНК подобрана таким образом, чтобы обеспечить встройку в район между генами транспортных РНК изолейцина и аланина в инвертированном повторе пластома, что согласно данным литературы дополнительно увеличивает частоту трансформации и выход рекомбинантных белков [4]. Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00545.

### Литература

1. Tang N, Xia Y, Zhan Y et al. Improvement of chloroplast transformation using CRISPR/Cas9. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2020;14(3):401–407. doi: 10.1166/jbmb.2020.1970.
2. Son S, Park SR. Challenges facing CRISPR/Cas9-based genome editing in plants. *Front Plant Sci*. 2022;13:902413. doi: 10.3389/fpls.2022.902413.
3. Tyurin AA, Kabardaeva KV, Berestovoy MA et al. Simple and reliable system for transient gene expression for the characteristic signal sequences and the estimation of the localization of target protein in plant cell. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017;64(5):672–679. doi: 10.1134/S1021443717040173.
4. Rozov SM, Sidorchuk YuV, Deineko EV. Transplastomic plants: problems of production and their solution. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2022;69:20. doi: 10.1134/S1021443722020157.

### EDITING TOOLS TO IMPROVE THE EFFICIENCY OF CHLOROPLAST GENOME TRANSFORMATION

Yu.V. Sidorchuk<sup>1\*</sup>, P.A. Belavin<sup>1</sup>, E.S. Khairulina<sup>1</sup>, D.E. Samodurov<sup>1</sup>, E.V. Deineko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences  
630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10

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

**Keywords:** chloroplasts, plastome, genome editing, transformation, transplastomic plants.

### ПРИМЕНЕНИЕ ФУКОКСАНТИНА ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ АНТИФИБРОТИЧЕСКОГО И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ММСК ПРИ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ

В.Н. Слаутин<sup>1,3\*</sup>, Д.Ю. Гребнев<sup>1,2</sup>, И.Ю. Маклакова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России  
620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3

<sup>2</sup> ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий  
620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

<sup>3</sup> ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора  
620030, Екатеринбург, ул. Летняя, 23

\*e-mail: vas-slautin@yandex.ru

**Ключевые слова:** фиброз печени, регенеративная медицина, фукоксантин, миофибробласты, плацентарные ММСК, TGF-β.

Внедрение в клиническую практику клеточных технологий как перспективного нехирургического лечения фиброза печени на современном этапе столкнулось с проблемами низкой выживаемости, низкой миграционной способности клеток и, как следствие, сниженного терапевтического потенциала при фиброзе печени [1, 2]. Цель исследования — изучение возможности комбинированного применения плацентарных ММСК и фукоксантина для увеличения их антифибротической эффективности.

Эксперимент выполнен на 40 мышах, распределённых на 4 группы: (1) интактную; (2)  $CCl_4$ ; (3) ММСК; (4) комбинированной терапии. Мышам из 2, 3, 4 группы вводили 2 мкл/г  $CCl_4$  внутривенно 2 р/д в течение 6 недель. Через 3 дня после последней инъекции  $CCl_4$  мыши получали: в хвостовую вену 1 млн. плацентарных ММСК на PBS однократно (3), PBS в эквивалентных дозах однократно (2), ММСК однократно и фукоксантин, разведённый в 200 мкл дистиллированной воды, в дозе 10 мг/кг через желудочный зонд ежедневно в течение 5 недель (4).

Для сравнения результатов терапии ММСК и их комбинации с фукоксантином изучены следующие показатели: выраженность фиброзных изменений по шкале METAVIR, площадь положительно-окрашенной на коллаген I, III области, иммуногистохимическим методом — количество  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов и CD45+ лейкоцитов, площадь положительно-окрашенной на TIMP-1 области. ИФА методом — уровень TGF- $\beta$  в гомогенате печени, уровни IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  — в сыворотке крови.

По результатам исследования установлено, что наибольшее влияние на показатели фиброза печени оказала комбинированная терапия. Так, при оценке выраженности фиброза печени в 3-й группе количество мышечной ткани с 3-й стадией фиброза по шкале METAVIR снизилось на 60% (40% — 2 ст.; 20% — 1 ст.) в 3 группе, в то время как в 4 группе снижение составило 80% (20% — 2 ст.; 50% — 1 ст.; 10% — 0 ст.). Результаты оценки снижения количества миофибробластов и площади, положительно окрашенной на коллаген I, III области в группе 4 также продемонстрировали наиболее выраженную эффективность. Уровень TGF- $\beta$  и площадь положительно-окрашенной на TIMP-1 области группы 4 достигли значений 1-й группы.

При изучении выраженности противовоспалительного действия уровень IL-1 $\beta$  в 4-й группе достиг показателей 1-й группы. Уровень TNF- $\alpha$  и количество лейкоцитов были значительно ниже в группе 4 по сравнению с группой 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стратегия терапии ММСК в комбинации с препаратами, обладающими антифибротическим действием, способна увеличить терапевтический потенциал и решить проблему внедрения клеточных технологий в практическую медицину.

#### Литература

1. Jovic D, Yu Y, Wang D et al. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2022;18:1525–1545.
2. Yuan M, Hu X, Yao L, Jiang Y, Li L. Mesenchymal stem cell homing to improve therapeutic efficacy in liver disease. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13:1–17.

## THE USE OF FUCOXANTHIN LEADS TO AN INCREASE IN THE ANTIFIBROTIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PLACENTAL MMSCS IN LIVER FIBROSIS

V.N. Slautin<sup>1,3\*</sup>, D.Yu. Grebnev<sup>1,2</sup>, I.Yu. Maklakova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Urals State Medical University»

620028, Ekaterinburg, Repin Str., 3

<sup>2</sup> Institute of Medical Cell Technologies

620026, Ekaterinburg, Karl Marx Str., 22a

<sup>3</sup> Federal Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome"

620030, Ekaterinburg, Letnyaya str., 23

\* e-mail: vas-slautin@yandex.ru

**Keywords:** liver fibrosis, regenerative medicine, fucoxanthin, myofibroblasts, placental MSC, TGF- $\beta$ .

## ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR/Cas9 И ddPCR ДЛЯ ПОИСКА ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЧАСТОТЫ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ЭС КЛЕТКАХ МЫШИ

А.В. Смирнов<sup>1\*</sup>, А.С. Рыжкова<sup>1</sup>, А.М. Юнусова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, Россия, пр. Ак. Лаврентьева, 10

\* e-mail: hldn89@gmail.com

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, двухцепочечные разрывы, геномные делеции, нуклеофекция, ddPCR, CRISPR/Cas9.

Один из подходов для изучения репарации двухцепочечных разрывов ДНК (double-strand breaks, DSBs) — создание и анализ частот структурных перестроек (делеций и инверсий). Это позволяет оценить влияние пространственной организации ДНК и хроматина на объединение двух отдаленных концов ДНК. Система CRISPR/Cas9 отлично подходит для этой задачи, благодаря неограниченному числу сайтов gРНК для внесения парных разрывов в геноме.

Недавно был предложен эффективный метод капельной цифровой ПЦР (ddPCR) для анализа частот делеций и инверсий в смешанной популяции клеток (ddXR). Мы решили протестировать его на эмбриональных стволовых (ЭС) клетках мыши, так как, в отличие от типичных культур клеток, репарация DSB в ЭС клетках слабо изучена. Мы выбрали условия для нуклеофекции RNP Cas9 и пар gРНК на участке гена *Ase2* на X-хромосоме (разрывы на расстоянии 3445 п.о. и 192 п.о.). В ходе оптимизации условий нуклеофекции мы оценили различные параметры (число клеток, настройки электропорации, концентрации RNP, тайминги возникновения делеций и т.д.). Для большинства проанализированных ЭС клонов частоты делеций по данным ddPCR находились в диапазоне 6–20%, а частоты инверсий — 2–10%.

Для оценки активности gРНК был использован метод TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition). TIDE позволяет «демультиплексировать» спектр мутаций в районе разрыва, используя файл секвеннограммы мутантного участка в смешанной популяции клеток. Число мутантных аллелей по версии TIDE было прямо пропорционально числу делеций по данным ddPCR. Так, ЭС клоны с высокой

частотой делеций имели около 60–70% мутаций в сайте 1 и 46–47% мутаций в сайте 2. Клоны с пониженной эффективностью разрезания Cas9 (альтернативные условия нуклеофекции) показали в два-три раза меньше мутаций в тех же сайтах (32–34% и 12–21%, соответственно). Интересно, что, если суммировать данные TIDE и частоты делеций/инверсий для некоторых ЭС клонов, общая эффективность Cas9 будет более 85–93 и 68–71%. Это доказывает высокую эффективность доставки RNP в ЭС клетки в нашем протоколе нуклеофекции.

Мы также провели серию предварительных экспериментов с добавлением ауксина, внося делеции в ЭС клоны с дегронами Rad21 (когезин), CapH2 (конденсин-II) и Smc2 (конденсины I-II). К данному моменту мы не обнаружили значимого эффекта от делеции Rad21, хотя некоторые публикации предсказывают рост числа перестроек. В то же время мы обнаружили достоверное увеличение числа инверсий на 20–110% во всех проанализированных биологических репликах с делецией Smc2, но не Rad21 или CapH2. Природу этого эффекта предстоит выяснить. Сейчас мы ведем анализ различных геномных районов в ЭС клетках мыши с дегронами когезина и конденсинов I/II. В дальнейшем разработанный метод и набор gPHK можно будет использовать для поиска других факторов, влияющих на появление структурных перестроек в геномах мыши. Исследование выполнено за счет гранта РФ № 22-74-00084.

#### COMBINING CRISPR/Cas9 AND ddPCR TO SEARCH FOR FACTORS AFFECTING GENOMIC REARRANGEMENT FREQUENCIES IN MOUSE ES CELLS

A.V. Smirnov<sup>1\*</sup>, A.S. Ryzhkova<sup>1</sup>, A.M. Yunusova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630090, Novosibirsk, Russia, Lavrentieva ave., 10

\*e-mail: hldn89@gmail.com

**Keywords:** embryonic stem cells, double-strand breaks, genomic deletions, nucleofection, ddPCR, CRISPR/Cas9.

#### КЛЕТочная ПЛАТФОРМА НА ОСНОВЕ ИПСК, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПАТОГЕННОГО ВАРИАНТА T1492G ГЕНА GLUD2 НА ФЕНОТИП НЕЙРАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Д.А. Сорогина<sup>1,2\*</sup>, А.В. Шубкин<sup>1,2</sup>,  
Е.В. Григорьева<sup>1</sup>, С.В. Павлова<sup>1</sup>, Е.С. Яркова<sup>1,2</sup>,  
С.П. Медведев<sup>1</sup>, А.А. Малахова<sup>1</sup>, С.М. Закиан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр институт  
цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\*e-mail: d.sorogina@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** ИПСК, нейральная дифференцировка, болезнь Паркинсона, глутаматдегидрогеназа 2-го типа.

Наследственная форма болезни Паркинсона (БП) может быть вызвана мутациями в различных генах, одним из которых является ген *GLUD2*, расположенный на X-хромосоме и не имеющий интронов. *GLUD2* кодирует митохондриальный фермент

глутаматдегидрогеназу второго типа, участвующий в окислении глутамата до α-кетоглутарата.

Мутация T1492G в гене *GLUD2* приводит к замене Ser445Ala в ферменте, что ведет к увеличению его активности. Повышенная активность глутаматдегидрогеназы ведет к гибели дофаминергических нейронов, что приводит к развитию БП.

Путем репрограммирования мононуклеарных клеток мы получили линии ИПСК двух разнополюх пациентов (PD40 — пациент мужского пола и PD47 — пациент женского пола) с мутацией T1492G в гене *GLUD2*. ИПСК были дифференцированы в релевантный тип клеток — дофаминергические нейроны, а также было показано нарушение работы митохондрий в нейронах.

Для изучения фенотипического проявления мутантного фенотипа на развитие наследственных болезней следует использовать изогенные контроли, так как это позволяет исключить вклад полиморфизмов, индивидуальных для каждого человека. Изогенные клеточные системы имеют различные генетические варианты изучаемого гена, в данном случае гена *GLUD2*.

ИПСК PD47 (46,XX) пациентки с БП, гетерозиготные по варианту X-сцепленного гена *GLUD2*, в результате случайной X-инактивации в эмбриогенезе, имеют разные активные гомологи X-хромосомы. Нами были проанализированы 45 линий ИПСК и выявлены линии с активными X-хромосомами, экспрессирующими патогенный вариант c.1492G или вариант «дикого типа» c.1492T, которые являются естественными изогенными линиями ИПСК PD47. Также с использованием технологии CRISPR/Cas9 нами были созданы изогенные трансгенные линии ИПСК «условно здорового» донора с внесённым в *AAVS1* локус гена *GLUD2* дикого типа c.1492T и с патогенным вариантом c.1492G под доксициклином-уравляемым промотором.

В результате нейральной дифференцировки изогенных линий в релевантный тип клеток будет получена клеточная платформа для изучения молекулярных механизмов развития БП, вызванной мутацией в гене *GLUD2*. Работа выполнена при поддержке проекта Министерства образования и науки РФ № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021 «Развитие «Коллекции культур клеток позвоночных» в качестве базового депозитария Российской коллекции типовых культур (RTCC) для обеспечения национальной технологической независимости и биобезопасности».

#### A CELL PLATFORM BASED ON IPSCS DERIVED FROM PARKINSON'S DISEASE PATIENTS TO STUDY THE INFLUENCE OF PATHOGENIC VARIANT T1492G OF THE GLUD2 GENE ON THE PHENOTYPE OF NEURAL DERIVATIVES

D.A. Sorogina<sup>1,2\*</sup>, A.V. Shubkin<sup>1,2</sup>,  
E.V. Grigor'eva<sup>1</sup>, S.V. Pavlova<sup>1</sup>, S.P. Medvedev<sup>1</sup>,  
A.A. Malakhova<sup>1</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Federal Research Center Institute of Cytology and  
Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, St. Pirogova, 1

\*e-mail: d.sorogina@g.nsu.ru

**Keywords:** iPSCs, neural differentiation, Parkinson's disease, type 2 glutamate dehydrogenase.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕРЕДАКТИРУЮЩИХ CRISPR СИСТЕМ ДЛЯ АКТИВАЦИИ КАНОНИЧЕСКОГО И НЕКАНОНИЧЕСКОГО ТЕРМОГЕНЕЗА БЕЛЫХ АДИПОЦИТОВ

Ю.С. Стафеев<sup>1\*</sup>, С.С. Мичурина<sup>1,2</sup>,  
М.А. Болдырева<sup>1,3</sup>, М.Ю. Агарёва<sup>1,2</sup>, В.А. Труонг<sup>4</sup>,  
М.Ю. Меньшиков<sup>1</sup>, Ю.Ч. Ху<sup>4</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова  
МЗ РФ

121500, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А

<sup>2</sup> Московский государственный университет им.  
М.В. Ломоносова

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1

<sup>3</sup> НИУ Высшая школа экономики

101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 20

<sup>4</sup> Национальный университет Цинь Хуа

300044, Синьчжу, Восточный район, ул. Гуанфу, д. 101

\*e-mail: yuristafeev@gmail.com

**Ключевые слова:** CRISPR системы, термогенез, биоэнергетика, адипоциты, белая жировая ткань, ожирение.

В настоящее время ожирение и сопутствующие заболевания являются существенной причиной смертности населения. Актуально развивающимся направлением экспериментальной эндокринологии является разработка генно-клеточных подходов к регуляции метаболизма как на уровне отдельных клеток и тканей, так и на системном уровне. Одним из активно используемых для этой цели биологических процессов является термогенез — процесс утилизации нутриентов в клетке с высвобождением энергии. Он может быть классическим (диссипация энергии через разобщающий белок митохондрий UCP1) и неклассическим (футильные циклы химических реакций, способствующие утилизации АТФ). В представленной работе мы проанализировали наш опыт применения нередактируемых CRISPR активаторных конструкций для стимуляции термогенеза в адипоцитах.

Первым звеном нашей работы являлось создание CRISPR конструкции для активации экспрессии гена *UCP1*. Данные конструкции были созданы на основе активаторной системы CRISPR с МРН комплексом и помещены в состав бакуловирусных векторов. Валидацию функционирования CRISPRa-UCP1 конструкций проводили на культуре зрелых адипоцитов. Было показано, что модифицированные CRISPRa-UCP1 системой адипоциты усиленно экспрессируют UCP1, имеют активный липолиз и усиленный термогенез. В дальнейшем CRISPRa-UCP1 модифицированные адипоциты помещали в состав тканеинженерной конструкции в Матригеле, трансплантировали мышам линии C57BL/6J и анализировали состав графта через 2 недели после трансплантации. Было показано, что в составе конструкций происходит экспрессия компонентов CRISPRa-UCP1 системы (dCas9), а также усилена экспрессия UCP1. Данные конструкции не вызывали системного и локального воспаления, успешно васкуляризовались и интегрировались в системный метаболизм животного. Введение такого конструкта здоровым мышам существенно не изменяло их метаболические показатели, что свидетельствует о безопасности и реализуемости данного подхода в дальнейших исследованиях в условиях метаболической патологии.

Далее мы проводили создание CRISPRa конструкций для активации креатинкиназного (гены *CKB* и *TNAP*) и триацилглицеридного (гены *GyK* и *ATGL*) футильных

циклов в адипоцитах. Данные конструкты также были помещены в бакуловирусные вектора и в клеточной культуре зрелых адипоцитов продемонстрировали активацию экспрессии целевых генов, а также снижение количества липидных капель.

Таким образом, результаты нашей работы показывают применимость и безопасность нередактируемых CRISPR систем для активации различных путей термогенеза в зрелых адипоцитах. Результаты работы в дальнейшем могут быть транслированы в клиническую практику как новый подход к коррекции ожирения и сопутствующих метаболических заболеваний. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-75-10085.

## THE USING OF NON-EDITING CRISPR SYSTEMS FOR CANONICAL AND NON-CANONICAL THERMOGENESIS ACTIVATION OF WHITE ADIPOCYTES

I.S. Stafeev<sup>1\*</sup>, S.S. Michurina<sup>1,2</sup>, M.A. Boldyreva<sup>1,3</sup>,  
M.Y. Agareva<sup>1</sup>, V.A. Truong<sup>4</sup>, M.Y. Menshikov<sup>1</sup>,  
Y.C. Hu<sup>4</sup>, Ye.V. Parfyonova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Centre for Cardiology  
named after academician E.I. Chazov

121500, Moscow, Akademik Chazov's street, 15A

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, GSP-1, Leninskiye gory, 1

<sup>3</sup> NRU Higher School of Economics

101000, Moscow, Myasnitskaya street, 20

<sup>4</sup> National Tsing Hua University

300044, Hsinchu, East District, Guangfu Road, 101

\*e-mail: yuristafeev@gmail.com

**Keywords:** CRISPR systems, thermogenesis, bioenergetics, adipocytes, white adipose tissue, obesity.

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА MYC

Е.В. Сухинина<sup>1\*</sup>, П.К. Козлова<sup>1</sup>, К.В. Невская<sup>1</sup>,  
Н.В. Литвяков<sup>2</sup>, А.Г. Першина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> СибГМУ, Центральная научно-исследовательская  
лаборатория, Центр биологических исследований  
и биоинженерии

634028, Томск, Московский тракт, 2, ст. 18

<sup>2</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ, лаборатория

онковирусологии

634009, Томск, пер. Кооперативный, 5

\*e-mail: suhininaev@mail.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9 SAM-активация, MYC, раковые стволовые клетки, рак молочной железы.

Приобретение свойств раковых стволовых клеток является одним из основных процессов опухолевой пластичности, позволяющих клеткам обратимо переключаться между пролиферативным метастатическим и дормантным лекарственно-резистентным состояниями [1]. Одним из генов, эктопическая экспрессия которых связана со способностью нестволовых раковых клеток к дедифференцировке, является ген *MYC* [2]. Создание изогенных клеточных линий с разным уровнем экспрессии *MYC* позволит детально исследовать механизмы опухолевой пластичности.

Целью исследования было создать клеточные линии рака молочной железы человека BT-549 с повышенной экспрессией гена *MYC*.

Для активации экспрессии был использован метод CRISPR/Cas9 SAM-активации [3]. Были сконструированы 3 рекомбинантные плазмиды, кодирующие направляющую РНК к участку промотора гена *MYC* человека. Далее, были разработаны лентивирусные частицы, кодирующие компоненты SAM-комплекса (dCas-VP64, MS2-rb5-HSF1) и разные направляющие РНК. Интеграция трансгенов, кодирующих компоненты SAM комплекса, в геном клетки-хозяина в результате трансдукции лентивирусными векторами обеспечивала стабильную активацию экспрессии целевого гена. После отбора клонов, устойчивых к антибиотику, и выделения моноклональной линии активация экспрессии гена *MYC* была подтверждена методами ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания с анти-*Myc* антителами. Профилирование экспрессии генов было выполнено при помощи полнотранскриптомных микроматриц Clarius S.

Получены изогенные клеточные линии карциномы молочной железы человека BT-549 (имеющей базально нормальный уровень экспрессии *MYC*) с активацией гена *MYC*. В клеточных линиях BT-549 с активацией гена *MYC* показано увеличение количества стволовых клеток (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>), а также они демонстрировали увеличение количества и диаметра образуемых маммосфер. Работа выполнена при поддержке гранта Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы по теме: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования» (соглашение № 075-15-2021-1073 от 29 сентября 2021 г.)

#### Литература

- Shi ZD et al. Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies. *Sig Transduct Target Ther.* 2023; 8(1):113.
- Litviakov N. et al. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis. *Oncotarget.* 2020; 11(21):1988.
- Zhang Y et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep.* 2015;5:16277.

#### DEVELOPMENT OF BREAST CANCER CELL LINES WITH DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *MYC* GENE

E.V. Sukhinina<sup>1,\*</sup>, P.K. Kozlova<sup>1</sup>, K.V. Nevskaya<sup>1</sup>, N.V. Litvyakov<sup>2</sup>, A.G. Pershina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SSMU, Central Research Laboratory, Center of Biological Research and Bioengineering  
634028, Tomsk, Moscow Tract, 2 ST18

<sup>2</sup> Tomsk NRMС, Cancer Research Institute, Laboratory of Viral Oncology  
634050, Tomsk, Kooperativny Street, 5

\*e-mail: suhininaev@mail.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9 SAM-activation, *MYC*, cancer stem cells, breast cancer.

#### ПРИМЕНЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТРАНС-СПЛАЙСИНГА ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ФИБРОЗА

А.Е. Толстолужинская<sup>1,2\*</sup>, М.Н. Карагаур<sup>1,2</sup>, Н.А. Басалова<sup>1,2</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова  
119192, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
119991, Москва, Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

\*e-mail: tolstoluzhinskayaae@my.msu.ru

**Ключевые слова:** α-гладкомышечный актин, транс-сплайсинг, миофибробласты, фиброз, TGF-β.

Основные эффекторные клетки фибротической ткани — миофибробласты, которые характеризуются повышенным синтезом специфических профибротических белков внеклеточного матрикса и синтезом α-гладкомышечного актина, или α-SMA, входящего в состав стресс-фибрилл. Миофибробласты накапливаются в результате дисбаланса между их элиминацией и образованием из клеток-предшественников, преимущественно фибробластов. В результате деятельности миофибробластов происходит разрастание фибротической ткани, что может привести к дисфункции органа. В связи с этим крайне важно изучать механизмы, заложенные в фиброзе. Однако на данный момент не существует релевантной модели фиброза, способной отразить динамичный, прогрессирующий характер его развития в различных тканях. Целью данной работы было создание модели фиброза *in vitro*, которая бы отражала ключевые процессы фиброгенеза и позволила бы изучать их в динамике.

Для этого была поставлена задача создать линию фибробластов человека с зависимой от стадии дифференцировки клеток экспрессией флуоресцентно-меченого α-SMA. При анализе литературы было замечено, что прежде создавались линии клеток только с конститутивной экспрессией α-SMA, что не позволяет наблюдать за изменениями в экспрессии. Нами же была разработана линия, в которой экспрессия α-SMA может быть индуцирована физиологическими стимулами, в том числе TGF-β — основным молекулярным индуктором дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Был разработан дизайн конструкции, которая несет в себе последовательность маркера GFP и устроена так, что в клетке происходит ее транс-сплайсинг с нативной пре-мРНК α-SMA по последнему интрону, в результате чего промотор итоговой мРНК остается нативным. При дифференцировке клеток в миофибробласты продукт трансляции данной мРНК должен встраиваться в стресс-фибриллы.

В результате лентивирусной трансдукции фибробластов человека полученным вектором мы обнаружили локальную экспрессию белка, связанного с GFP и формирующего стресс-фибриллы, что совпадало с локализацией белка, меченого антителами против α-SMA. Уровень данного белка повышался в некоторых клетках линии при стимуляции дифференцировки клеток TGF-β. Линия также использовалась для создания 3D модели, созданной на основе клеточных сфероидов и имитирующей структуру фибротической ткани.

Несмотря на успехи в разработке линии, на данный момент мы работаем над увеличением специфичности

транс-сплайсинга, чтобы исключить образование нецелевых флуоресцентно-меченных молекул в трансдуцированных фибробластах. В дальнейшем получение данной системы позволит нам исследовать основной процесс фиброза — трансдифференцировку миофибробластов, что позволит нам создавать более сложные модели фиброза и исследовать их в режиме реального времени. Исследование было выполнено в рамках Государственного задания МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова.

### APPLICATION OF THE TRANS-SPLICING MECHANISM TO CREATE A CELLULAR MODEL OF FIBROSIS

A.E. Tolstoluzhinskaya<sup>1,2\*</sup>, M.N. Karagayur<sup>1,2</sup>, N.A. Basalova<sup>1,2</sup>, A.Y. Efimenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University

119192, Moscow, Lomonosovsky Ave., 27/10

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Lomonosovsky Ave., 27/1

\*e-mail: tolstoluzhinskayaee@my.msu.ru

**Keywords:**  $\alpha$ -smooth muscle actin, trans-splicing, myofibroblasts, fibrosis, TGF- $\beta$ .

### ИНГИБИРОВАНИЕ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИЮ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ LRRK2 И GBA1

Т.С. Усенко<sup>1,2\*</sup>, К.С. Башарова<sup>1</sup>, А.И. Безрукова<sup>1,2</sup>, Е.В. Григорьева<sup>3</sup>, С.В. Павлова<sup>3</sup>, Г.В. Байдакова<sup>4</sup>, С.П. Медведев<sup>3</sup>, И.В. Милюхина<sup>5</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>4</sup>, С.Н. Пчелина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики имени НИЦ Б.П. Константинова «Курчатовский институт»  
188300, Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова  
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 10

<sup>4</sup> Медико-генетический научный центр  
115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

<sup>5</sup> Институт мозга человека РАН  
197376, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12А

\*e-mail: tatiana.s.usenko@gmail.com

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, глюкоцереброзидаза, LRRK2, GBA1, дофаминергические нейроны.

Мутации в гене обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), кодирующем киназу LRRK2, и гене GBA1, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), являются наиболее распространенными генетическими причинами

распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП). Последние данные указывают на возможную связь двух ферментов LRRK2 и GCase. Так, было показано, что активность GCase снижается в клетках, мутантных по гену LRRK2. В то же время ингибирование киназной активности LRRK2 влияет на активность GCase в клетках мутантных по гену GBA1.

Цель данного исследования заключалась в оценке эффективности ингибирования киназной активности LRRK2 в восстановлении функции GCase в дофаминергических нейронах (ДН), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) у пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в гене GBA1 и LRRK2 (GBA-БП, LRRK2-БП, соответственно).

Культивирование и дифференцировку ИПСК в ДН пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП проводили по ранее опубликованному протоколу [1]. Дифференцированные ДН культивировали в течение 12 дней в присутствии ингибитора киназной активности MLi-2 (с=600 нМ). Уровень транслокации GCase в лизосому определяли по уровню колокализации GCase с лизосомальным маркером LAMP2 с помощью конфокальной микроскопии (Leica ТК-СП5). Активность GCase оценивали с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, уровень белка GCase — вестерн-блоттингом. Эффективности ингибирования киназной активности LRRK2 оценивали по соотношению уровней фосфорилированной и нефосфорилированной формы белка Rab10 определяемых с помощью вестерн-блоттинга.

Активность GCase была снижена в ДН пациентов с GBA-БП по сравнению с LRRK2-БП и контролем (p=0,00019, p=0,0029, соответственно). Ингибирование киназной активности LRRK2 увеличивало активность (p<0,05) и уровень GCase (p=0,013, p=0,042, p=0,016, соответственно), а также степени колокализации GCase с LAMP2 (p<0,0001) в ДН пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП, а также в контроле по сравнению с ДН соответствующих групп культивируемых без MLi-2.

Нами впервые было показано, что ингибирование киназной активности LRRK2 восстанавливает транспорт GCase в лизосомы, уровень GCase, а также активность GCase в ДН пациентов с GBA-БП и влияет на данные параметры в группе пациентов с LRRK2-БП. Наши результаты подтверждают и расширяют данные о функциональном взаимодействии LRRK2 и GCase. Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-25-00501.

#### Литература

1. Grigor'eva EV, Kopytova AE, Yarkova ES et al. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease. Int J Mol Sci. 2023;24(5):4437.



### LRRK2 KINASE ACTIVITY INHIBITION INFLUENCES ON GLUCOCEREBROSIDASE FUNCTION IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED DOPAMINERGIC NEURONS FROM PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN THE GBA1 AND LRRK2 GENES

T.S. Usenko<sup>1,2\*</sup>, K.S. Basharova<sup>1</sup>, A.I. Bezrukova<sup>1,2</sup>, E.V. Grigor'eva<sup>3</sup>, S.V. Pavlova<sup>3</sup>, G.V. Baydakova<sup>4</sup>, S.P. Medvedev<sup>3</sup>, I.V. Miliukhina<sup>5</sup>, E.Yu. Zakharova<sup>4</sup>, S.N. Pchelina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute»

188300, Gatchina, 1, mkr. Orlova roshcha

<sup>2</sup> Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University

197022, Saint-Petersburg, L'va Tolstogo str. 6-8

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

630090, Novosibirsk, 10, Ac. Lavrentieva ave.

<sup>4</sup> Research Centre for Medical Genetics

115522, Moscow, Moskvorechye St., 9

<sup>5</sup> Institute of the Human Brain RAS

197376, Saint-Petersburg, st. Acad. Pavlova, 12A

\*e-mail: tatiana.s.usenko@gmail.com

**Keywords:** Parkinson's disease, glucocerebrosidase, LRRK2, GBA1, dopaminergic neurons.

### ДИНАМИКА ДВИГАТЕЛЬНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА ПРИ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА

Е.А. Хабарова<sup>1\*</sup>, П.И. Пилипенко<sup>2</sup>, Н.П. Денисова<sup>1</sup>, Ф.А. Ефремов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Федеральный центр нейрохирургии  
630087, Новосибирск, ул. Немировича-Данченко 132/1

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России  
630091, Новосибирск, Красный проспект 52

\*e-mail: e\_habarova@neuronsk.ru

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, нейростимуляция субталамического ядра.

Основным методом лечения пациентов с болезнью Паркинсона в настоящее время является фармакотерапия. После появления осложнений медикаментозной терапии, встает вопрос о применении нейрохирургического лечения с целью коррекции симптомов паркинсонизма. Наиболее часто используемой нейрохирургической методикой для коррекции симптомов паркинсонизма является нейростимуляция субталамического ядра с двух сторон.

Целью исследования явились оценка и сравнение двигательных проявлений у пациентов с болезнью Паркинсона на фоне нейростимуляции субталамического ядра с двух сторон в различные послеоперационные периоды.

Проанализирована группа пациентов из 40 человек, которым проводилась нейростимуляция субталамического ядра с двух сторон (22 женщины и 18 мужчин), со смешанной формой болезни Паркинсона в возрасте от 48 до 67 лет (Me = 56 лет [53; 61]).

Длительность заболевания варьировала от 6 до 16 лет (Me = 10,5 лет [7; 14]). Пациенты имели 3 стадию болезни Паркинсона по шкале Хен-Яра, у них отмечались двусторонние проявления ригидности, тремора покоя, гипокинезия и начальные постуральные нарушения. Оценка двигательных нарушений проводилась по унифицированной шкале болезни Паркинсона (UPDRS II + III). Послеоперационное наблюдение осуществлялось через 3, 6, 12 и 24 месяца.

Вычисление достоверности различий между повторными измерениями в сопряженных группах проводилось с помощью теста Фридмана, двунаправленного. Попарные сравнения достоверности различий между отдельными измерениями в сопряженных группах проводили с помощью теста Вилкоксона (двунаправленного) с FDR-коррекцией р-значений.

До оперативного лечения степень тяжести составила 89,5 [84,5; 100,5] баллов. Через 3 месяца после операции этот показатель составил 34 [31,75; 37] балла (p = 0.0000948), через 6 месяцев — 34,5 [32; 37] балла (p = 0.000095), через 12 месяцев — 34,5 [32; 37,25] балла (p = 0.0000952), через 24 месяца — 34 [31,75; 37,25] (p = 0.0000942).

Таким образом, на фоне проведения двухсторонней нейростимуляции субталамического ядра отмечено значимое уменьшение степени тяжести двигательных проявлений во все периоды после оперативного лечения. При этом влияние нейростимуляции было неизменным на всех этапах послеоперационного наблюдения.

### MOTOR EFFECTS OF DEEP BRAIN STIMULATION OF THE SUBTHALAMIC NUCLEUS IN PARKINSON'S DISEASE PATIENTS

Е.А. Khabarova<sup>1\*</sup>, P.I. Pilipenko<sup>2</sup>, N.P. Denisova<sup>1</sup>, F.A. Efremov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FSBI "Federal Neurosurgical Center" Novosibirsk  
630087, Novosibirsk, ul. Nemirovicha-Danchenko 132/1

<sup>2</sup> Novosibirsk State Medical University  
630091, Novosibirsk, Krasny prospect 52

\*e-mail: e\_habarova@neuronsk.ru

**Keywords:** Parkinson disease, STN DBS.

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ КОНЬЮГАТЫ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

И.В. Черников\*, И.К. Бачкова, Д.В. Гладких, М.И. Мещанинова, М.С. Купрюшкин, С.А. Жуков, В.В. Власов, М.А. Зенкова, Е.Л. Черноловская

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

\*e-mail: chernikovivanv@gmail.com

**Ключевые слова:** Малые интерферирующие РНК, холестерин-содержащая siРНК, химические модификации РНК.

РНК-интерференция (РНКi) — процесс сиквенс-специфического подавления экспрессии генов, индукторами которого являются малые интерферирующие РНК (siРНК), однако их использование в биомедицине ограничено недостаточной эффективностью доставкой в цитоплазму клеток-мишеней и чувствительностью siРНК к действию нуклеаз.

Путём варьирования липофильной молекулы, её места присоединения, длины и природы линкера между липофильной молекулой и siPHK нами была разработана холестерин-содержащая siPHK (Ch-siRNA). Мы показали, что Ch-siRNA способен накапливаться в опухоли животного после i.v. или p.t. введения и на 60% снижать экспрессию терапевтически значимого гена-мишени *MDR1*. Комбинирование введения Ch-siRNA с полихимиотерапией позволяет в 2 раза увеличить эффективность противоопухолевой терапии по сравнению со стандартной полихимиотерапией.

Несмотря на высокую эффективность проникновения Ch-siRNA внутрь клеток, доля siPHK непродуктивно задерживающейся в эндосомах и не участвующей в РНКi велика. Для решения проблемы выхода siPHK из эндосом нами было предложено конъюгировать Ch-siPHK с эндосомолитическими пептидами, а для упрощения синтеза использовать модульные внутрисегментированные sisiPHK. Показано, что в присутствии фармакологически разрешенного агента, ингибирующего созревание эндосом, пептидные конъюгаты Ch-sisiRNA снижали экспрессию гена-мишени в 2–2,5 раза более эффективно по сравнению с исходными Ch-sisiRNA, не содержащими пептида, за счет усиления выхода препарата из эндосом.

Устойчивость siPHK к действию нуклеаз является основным фактором, определяющим её длительность действия, 2'-F, 2'-OMe и PS модификации используются для ее стабилизации. Использование новой мезильной модификации ( $\mu$ ) может значительно улучшить фармакологические свойства siPHK. Мы показали, что введение  $\mu$  в смысловую цепь так и в большинство позиций антисмысловой siPHK и их комбинации, практически не ингибирует РНКi. Таким образом, можно ожидать что использование  $\mu$  модификации может снизить токсичность siPHK за счет снижения количества токсичных PS в ее составе и, в значительной степени, увеличить длительность её биологического действия.

Таким образом, использование современного арсенала химических модификаций превращает siPHK в универсальную терапевтическую платформу для коррекции экспрессии генов, связанных с заболеваниями. Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-14-00251.

## ANTI-TUMOR CONJUGATES OF SMALL INTERFERING RNA

I.V. Chernikov\*, I.K. Bachkova,  
D.V. Gladkikh, M.I. Meschaninova,  
M.S. Kupryushkin, S. Zhukov, V.V. Vlassov,  
M.A. Zenkova, E.L. Chernolovskaya

*Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine SB RAS*

630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Avenue

\*e-mail: chernikovivanv@gmail.com

**Keywords:** Small interfering RNA, cholesterol-modified siRNA, chemical modification of RNA.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FLNC* В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ *FLNC*-АССОЦИИРОВАННОЙ РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

М.Ю. Шарикова<sup>1\*</sup>, Д.В. Голиусова<sup>1,2</sup>,  
И.В. Копылова<sup>1</sup>, М.В. Терякова<sup>1</sup>, О.С. Лебедева<sup>1,3</sup>,  
А.Н. Богомазова<sup>1,3</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>3</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

\*e-mail: sharikova.marg@yandex.ru

**Ключевые слова:** рестриктивная кардиомиопатия, ген *FLNC*, филамин С, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), кардиомиоциты.

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) — это орфанная патология миокарда, характеризующаяся ригидностью стенок желудочков и диастолической дисфункцией. РКМП часто связана с мутациями генов, кодирующих белки цитоскелета или саркомеров [1]. Одним из генов, ассоциированных с РКМП, является ген гомодимерного актин-связывающего белка филамина С — *FLNC* [1,2].

Удобной моделью для изучения патогенеза РКМП являются кардиомиоциты, получаемые *in vitro* путём направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с диагнозом РКМП [3]. В нашей лаборатории ранее получены ИПСК *ips-fil24* из фибробластов пациента с гетерозиготной мутацией с.7416\_7418delGAA в гене *FLNC*. В кардиомиоцитах данного пациента предполагается компенсаторное повышение экспрессии аллеля дикого типа гена *FLNC* для восполнения недостатка мономеров белка нормального строения. Целью настоящего исследования являлась оценка соотношения экспрессии аллеля дикого типа и мутантного аллеля (*wt/mut*) гена *FLNC* в кардиомиоцитах и других пациент-специфичных клеточных производных ИПСК линии *ips-fil24*. Основным методом исследования служила количественная ОТ-ПЦР с использованием аллель-специфичных проб типа TaqMan.

Анализ соотношения экспрессии аллелей *wt/mut* гена *FLNC* в ИПСК линии *ips-fil24* и в полученных из них кардиомиоцитах, нейральных клетках-предшественниках, клетках дефинитивной энтодермы и фибробластоподобных производных опроверг первоначальную гипотезу о тканеспецифичной повышенной экспрессии аллеля дикого типа гена *FLNC*. В полученной нами клеточной модели РКМП в кардиомиоцитах пациента не наблюдается значительного сдвига экспрессии гена *FLNC* в сторону какого-либо из аллелей: мутантного или дикого типа. В дальнейшем нами планируется проведение аналогичных исследований других линий ИПСК того же пациента, одна из которых независимо получена в США. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-00456).

### Литература

1. Brodehl A, Gerull B. Genetic insights into primary restrictive cardiomyopathy. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(8):2094.

- Leber Y, Ruparelia AA, Kirfel G et al. Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(13):2776–2788.
- Perpelina K, Khudiakov A, Rodina N et al. Generation of iPSC line FAMRCiO10-A from patient with restrictive cardiomyopathy carrying genetic variant FLNC p.Gly2011Arg. *Stem Cell Research*. 2021;59:102639.
- Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S et al. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Developmental Biology*. 2012;361(1):79–89.

### FLNC GENE EXPRESSION IN A CELL MODEL OF FLNC-ASSOCIATED RESTRICTIVE CARDIOMYOPATHY

M.Y. Sharikova<sup>1\*</sup>, D.V. Goliusova<sup>1,2</sup>,  
I.V. Kopylova<sup>1</sup>, M.V. Teryakova<sup>1</sup>, O.S. Lebedeva<sup>1,3</sup>,  
A.N. Bogomazova<sup>1,3</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Lopukhin federal research and clinical center of physical-chemical medicine of Federal medical biological agency

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

<sup>2</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, Vavilova Street, 26

<sup>3</sup> Center of precise editing and genetic technologies for biomedicine

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

\*e-mail: sharikova.marg@yandex.ru

**Keywords:** restrictive cardiomyopathy, FLNC gene, filamin C, induced pluripotent stem cells (iPSCs), cardiomyocytes.

### НАИВНЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА: МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ И CRISPR-ТЕХНОЛОГИИ

А.И. Шевченко\*, А.М. Арссан, Д.Е. Поливец,  
С.П. Медведев, С.М. Закиян, И.С. Захарова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** наивные плюрипотентные стволовые клетки человека, редактирование генома.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека, получаемые и поддерживаемые в обычных условиях с использованием фактора роста фибробластов, характеризуются генетической гетерогенностью, эпигенетической памятью и нестабильностью эпигенетического статуса X-хромосом, что затрудняет их применение в биомедицинских исследованиях. Надежды на преодоление проблем, обусловленных генетической и эпигенетической гетерогенностью плюрипотентных клеток человека, связывают с получением культур наивных ПСК, соответствующих по характеристикам бластомерам на ранних стадиях преимплантационного развития эмбриона. Однако предложенные в настоящее время около десятка сред для получения и поддержания ПСК в наивном состоянии позволяют решить эти проблемы лишь отчасти [1]. В данном исследовании мы продолжили поиск

и тестирование новых компонентов и их комбинаций для получения наивных ПСК человека и выявили ряд условий культивирования, которые бы способствовали клоногенности ПСК, более длительной стабильности их генома, способности поддерживать механизмы дозовой компенсации генов X-хромосомы, повышению эффективности программируемых нуклеаз Cas при редактировании генома. Полученные результаты предлагают ряд доступных и полезных решений для применения наивных ПСК в научных и трансляционных исследованиях. Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 21-15-00065.

### Литература

- La Regina A, Pedone E, Marucci L. Culturing pluripotent stem cells: State of the art, challenges and future opportunities. *Current Opinion in Systems Biology*. 2021;28:100364. doi: 10.1016/j.coisb.2021.100364.

### HUMAN NAÏVE PLURIPOTENT STEM CELLS: DISEASE MODELLING AND CRISPR TECHNOLOGIES

A.I. Shevchenko\*, A.M. Arssan, D.E. Polivtsev,  
S.P. Medvedev, S.M. Zakian, I.S. Zakharova

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10

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

**Keywords:** human naïve pluripotent stem cells, genome editing.

### ИЗУЧЕНИЕ СИНДРОМА КОЭНА НА ОСНОВЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИПСК С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *COH1*

Т.А. Шнайдер<sup>1</sup>, К.Н. Морозова<sup>1,2</sup>, А.А. Хабарова<sup>1</sup>,  
С. Четкина<sup>2</sup>, А. Чвилева<sup>2</sup>, А. Юнусова<sup>1</sup>,  
Е. Вольф<sup>1</sup>, Е.В. Киселева<sup>1</sup>, И.Е. Пристяжнюк<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

**Ключевые слова:** синдром Коэна, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточные модели, умственная отсталость, нейродегенеративные заболевания.

Технологии получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их направленной дифференцировки в нейральные клетки — перспективное направление в изучении патологических механизмов заболеваний человека. Данные подходы уже широко применяются для изучения и моделирования нарушений развития головного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Однако для изучения клеточных и молекулярных механизмов синдрома Коэна данный подход не был применен.

Синдром Коэна — это редкое врожденное аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с мутациями в гене *COH1* (*VPS13B*) и характеризующееся задержкой физического и умственного развития, микроцефалией, гипермобильностью суставов, гипотонией, дистрофией сетчатки и нейтропенией.

Целью исследования стало выявление структурно-функциональных нарушений в культуре нейронов с мутацией *COH1*. В ходе работы нами были получены ИПСК из моноцитов и фибробластов двух пациентов с синдромом Коэна. Нами показано, что мутации в гене *COH1* вызывают серьезные патологические изменения в фибробластах, нейральных стволовых клетках и нейронах пациентов с синдромом Коэна. Иммуноцитохимический и ультраструктурный анализ нейронов выявил серьезные нарушения внутренней организации, в том числе и уже упоминавшиеся в литературе, такие как фрагментация аппарата Гольджи и накопление аутолизосом. Однако мы также нашли большое число нарушений, которые могут свидетельствовать о нейродегенеративном характере изменений и сходстве с возрастными нейродегенеративными заболеваниями, такие как стресс ЭПР, нарушение структуры и повреждение митохондрий, повреждение и разбухание мембранных органоидов клетки, характерные для нейродегенеративных заболеваний. Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0019 ИЦиГ СО РАН и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Культивирование линий клеток проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells>).

#### STUDY OF COHEN'S SYNDROME ON THE BASIS OF PATIENT-SPECIFIC IPSC WITH A MUTATION IN THE *COH1* GENE

T.A. Schneider<sup>1</sup>, K.N. Morozova<sup>1,2</sup>, A.A. Khabarova<sup>1</sup>, S. Chechetkina<sup>2</sup>, A. Chvileva<sup>2</sup>, A. Yunusova<sup>1</sup>, E. Wolf<sup>1</sup>, E.V. Kiseleva<sup>1</sup>, I.E. Pristyazhnyuk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
630090, Novosibirsk, Russia, Lavrentieva ave., 10

<sup>2</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2

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

**Keywords:** Cohen's syndrome, induced pluripotent stem cells, cell models, mental retardation, neurodegenerative diseases.

#### ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА с.1977G>A (p.M659I) В ГЕНЕ *MYH7* С НЕЯСНЫМ КЛИНИЧЕСКИМ ЗНАЧЕНИЕМ НА МОРФОЛОГИЮ КАРДИАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК

A.E. Shulgina<sup>1\*</sup>, S.V. Pavlova<sup>1</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>, E.V. Dementyeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10

\* e-mail: ange.shulgina@yandex.ru

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR/Cas9, кардиомиоциты, гипертрофическая кардиомиопатия, клиническое значение вариантов.

Внедрение методов секвенирования нового поколения в клиническую практику привело к выявлению многочисленных вариантов с неясным клиническим значением в генах, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией

(ГКМП). При генетическом анализе больных ГКМП нами был обнаружен вариант с неясным клиническим значением с.1977G>A (p.M659I) в гене *MYH7*, аминокислотная замена расположена в актин-связывающей области моторного домена миозина [1]. CRISPR/Cas9 — уникальный инструмент, открывающий перспективы для выяснения роли генетических вариантов в патогенезе гипертрофической кардиомиопатии. Для изучения патогенности варианта p.M659I в гене *MYH7* мы внесли замену в геном линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора ICGiO22-A [2] с помощью технологии CRISPR/Cas9, используя комбинацию двух одноцепочечных доноров (с мутацией и без нее) для моделирования гетерозиготного состояния гена, поскольку пациент был гетерозиготным носителем варианта. В результате, была получена линия ИПСК, гетерозиготная по варианту p.M659I в гене *MYH7*. Одним из признаков ГКМП, воспроизводимых на моделях заболевания на основе ИПСК, является увеличение размеров кардиомиоцитов. В качестве положительного контроля мы получили линию ИПСК от пациента с ГКМП, несущего известный патогенный вариант, с.966G>A (p.W322X) в гене *MYBPC3*. Мы дифференцировали линии ИПСК с внесенным вариантом p.M659I в гене *MYH7*, ИПСК пациента с данным генетическим вариантом, ИПСК с патогенным вариантом p.W322X в гене *MYBPC3* и ИПСК от здоровых доноров (включая исходную линию ICGiO22-A) в кардиомиоциты. Анализ размеров показал, что кардиомиоциты, полученные из линии ИПСК с вариантом p.M659I в гене *MYH7*, введенным с помощью CRISPR/Cas9, и пациент-специфичных линий ИПСК, включая линию ИПСК с патогенным вариантом, имели увеличенный размер по сравнению с таковыми, дифференцированными из ИПСК здоровых доноров. Таким образом, внесение варианта p.M659I в ген *MYH7* ИПСК здорового донора вызывало проявление по крайней мере одного из признаков ГКМП, что указывает на возможную патогенность данного варианта. Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00271.

#### Литература

1. Dementyeva EV, Vyatkin YV, Kretov EI et al. Genetic analysis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Genes and Cells*. 2020;15:68–73. doi:10.23868/202011011.
2. Malakhova AA, Grigor'eva EV, Pavlova SV et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGiO21-A and ICGiO22-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res*. 2020;48:101952. doi: 10.1016/j.scr.2020.101952.

#### STUDYING PATHOGENIC CONTRIBUTION OF GENETIC VARIANT WITH UNCERTAIN SIGNIFICANCE с.1977G>A (p.M659I) IN THE *MYH7* GENE ON THE MORPHOLOGY OF CARDIAC DERIVATIVES OF INDUCED PLURIPOTENT CELLS

A.E. Shulgina<sup>1\*</sup>, S.V. Pavlova<sup>1</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>, E.V. Dementyeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
630090, Novosibirsk, prospekt Lavrentyeva 10

\* e-mail: ange.shulgina@yandex.ru

**Keywords:** induced pluripotent stem cells, CRISPR/Cas9, cardiomyocytes, hypertrophic cardiomyopathy, clinical significance of variants.

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ЛИМБАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ В СОСТАВЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Я. Юй<sup>1\*</sup>, А.Ю. Андреев<sup>1,2</sup>,  
О.С. Роговая<sup>3</sup>, Е.О. Осидак<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней»  
119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А, Б

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН»  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>4</sup> ООО фирмы «Имтек»  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15А

\*e-mail: woaiwuhuarou363@gmail.com

**Ключевые слова:** лимбальные стволовые клетки, лимбальная недостаточность, коллаген, тканеинженерная конструкция

Эпителий роговицы находится в состоянии постоянного обновления за счет лимбальных стволовых клеток (ЛСК), находящихся в палисадах Vogt лимба [1]. В настоящее время сформировалось понятие о лимбальной недостаточности (ЛН), клиника которой проявляется в виде эрозии, помутнения, конъюнктивизации, неоваскуляризации роговицы, а также снижения зрения. Тактика лечения ЛН заключается в анатомо-функциональном восстановлении поврежденного лимба консервативными или хирургическими методами [2]. Одним из самых перспективных методов лечения ЛН считается трансплантация культивированных ЛСК на основе разных носителей [3].

Цель работы — оценить эффективность лечения ЛН с помощью тканеинженерной конструкции из культивированных ЛСК на основе коллагеновой мембраны у экспериментальных животных.

Исследование выполнено на 6 кроликах с предварительно индуцированной ЛН, разделенных на 2 группы лечения: в опытной группе — трансплантация тканеинженерной конструкции (3 шт.), в контрольной — консервативное лечение (3 шт.). Тканеинженерная конструкция состояла из культивированных ЛСК и коллагеновой мембраны Viscoll. Клетки были получены из биоптата лимба. Фенотип, пролиферативную активность и выживаемость культивированных клеток определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа и окраски витальными красителями. Для оценки эффективности лечения были проведены следующие исследования: биомикроскопия с флуоресцеиновой пробой, ОКТ переднего отрезка глаза, импрессионная цитология (ИЦ), гистология и иммуногистохимическое исследование.

Культивированные клетки на коллагеновой мембране представляли собой смесь ЛСК и МСК с высокой выживаемостью и пролиферативной активностью. На 30-й день в опытной группе была выявлена прозрачная роговица, а в контрольной сохранялись все признаки ЛН. Гистология и ИЦ подтвердили отсутствие бокаловидных клеток в эпителии роговицы в опытной группе. По данным иммуногистохимического анализа в обеих группах были обнаружены СК14+, СК3/76+, P63+ клетки, свидетельствующие о наличии роговичных эпителиальных клеток и ЛСК.

Коллагеновый носитель способствует поддержанию жизнеспособности, пролиферации и сохранности фенотипа клеток. Трансплантации тканеинженерной конструкции из культивированных ЛСК и коллагеновой мембраны является эффективным методом для лечения ЛН в эксперименте.

### Литература

1. Ying PX, Fu M, Huang C et al. Profile of biological characterizations and clinical application of corneal stem/progenitor cells. *World Journal of Stem Cells*. 2022;14(11):777–797.
2. Deng SX, Kruse F, Gomes JAP et al. Global consensus on the management of limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2020;39:1291–1302.
3. Tran TM, Hou JH. Clinical applications of bioengineered tissue-cellular products for management of corneal diseases. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2023;34(4):311–323.

## TRANSPLANTATION TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTS OF CULTURED LIMBAL STEM CELLS FOR THE TREATMENT OF LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Y. Yu<sup>1\*</sup>, A.Y. Andreev<sup>1,2</sup>, O.S. Rogovaya<sup>3</sup>, E.O. Osidak<sup>4</sup>

<sup>1</sup> The State Education Institution of Higher Professional Training The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation  
119992, Moscow, 8-2, Trubetskaya street

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution of Science "M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases"  
119021, Moscow, 11A, Rossolimo street

<sup>3</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Science  
119334, Moscow, 26, Vavilova street

<sup>4</sup> Imtek Ltd.  
121552, Moscow, 15-a, 3rd. Cherepkovskaya street

\*e-mail: woaiwuhuarou363@gmail.com

**Keywords:** limbal stem cell, limbal stem cell deficiency, collagen, tissue-engineered construct.

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДВУХВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ААВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ В ДОКЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

И.А. Яковлев<sup>1,4\*</sup>, А.М. Емелин<sup>2</sup>, Я.С. Слесаренко<sup>1</sup>,  
И.С. Лимаев<sup>2</sup>, Ю.А. Ветрова<sup>2</sup>, Е.В. Кузубова<sup>3</sup>,  
В.М. Покровский<sup>3</sup>, П.А. Лебедев<sup>3</sup>,  
С.Н. Бардаков<sup>4</sup>, А.А. Исаев<sup>4</sup>, Р.В. Деев<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> ООО «Генотаргет», Инновационный центр «Сколково»  
Москва, mail@genotarget.com

<sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России  
Санкт-Петербург, rectorat@szgmu.ru

<sup>3</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
Белгород, korokin@bsu.edu.ru

<sup>4</sup> ПАО «Артген Биотех»  
Москва, mail@genotarget.com

\*e-mail: ivan@ivan-ya.ru

**Ключевые слова:** миодистрофия, дисферлинопатия, генная терапия, адено-ассоциированный вирус.

Дисферлинопатии — аутосомно-рецессивные заболевания мышц, вызванные мутациями в гене *DYSF*, который кодирует белок дисферлин размером 237 кДа. В связи с генетической природой этих заболеваний, разработка генной терапии становится ключевым аспектом. Одной из проблем разработки такой терапии является большой размер кДНК *DYSF*, превышающий емкость аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), который часто применяется в подобных исследованиях. Для преодоления имеющегося ограничения обычно используют два независимых вектора AAV, несущих части гена *DYSF* с перекрывающейся последовательностью. В данной работе мы оценили эффективность двухвекторной системы AAV9.DYSF с кодон-оптимизированным геном *DYSF* как *in vitro*, так и *in vivo*.

Для этого была создана двухвекторная система AAV9.DYSF с перекрывающимися последовательностями кДНК *DYSF*. Два вектора AAV собраны отдельно по стандартному протоколу из плазмид, несущих части гена *DYSF*. Эффективность *in vitro* оценивали на модели искусственных миобластов из дисферлин-дефицитных фибробластов за счет сверхэкспрессии MyoD. Метод обнаружения мРНК — ПЦР-РВ. Исследования *in vivo* проводили на мышинной модели дисферлинопатии (Bla/J). Белок *DYSF* определяли с помощью ИГХ реакции.

После трансдукции клеточной линии конструкцией AAV9.DYSF мы детектировали транскрипцию мРНК *DYSF*, уровень мРНК был в 7 раз выше по сравнению с эталонным геном (*GAPDH*). В *in vivo* экспериментах после внутримышечного введения двухвекторной системы эффективность трансдукции достигла 30%. Анализ распределения дисферлина в поперечных срезах скелетной мышечной ткани после введения вирусного вектора показал различный характер локализации белка (мембранный, смешанный цитоплазматический и мембранный).

Увеличение уровня транскрипции мРНК *DYSF* после трансдукции клеток и эффективная трансдукция в мышинной модели свидетельствуют о дальнейшей возможности использования двухвекторных систем на основе AAV в разработке генной терапии дисферлинопатии.

#### EFFICIENCY ANALYSIS OF DUAL ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR SYSTEM FOR DYSFERLINOPATHY TREATMENT IN A PRECLINICAL STUDY

I.A. Yakovlev<sup>1,4\*</sup>, A.M. Emelin<sup>2</sup>, Y.S. Slesarenko<sup>1</sup>, I.S. Limaev<sup>2</sup>, I.A. Vetrova<sup>2</sup>, E.V. Kuzubova<sup>3</sup>, V.M. Pokrovskii<sup>3</sup>, P.A. Lebedev<sup>3</sup>, S.N. Bardakov<sup>4</sup>, A.A. Isaev<sup>4</sup>, R.V. Deev<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Genotarget LLC, Skolkovo Innovation Center  
Moscow, Russia, mail@genotarget.com

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov North-West State Medical University,  
Ministry of Health of the Russian Federation  
St. Petersburg, Russia, rectorat@szgmu.ru

<sup>3</sup> Belgorod State National Research University  
Belgorod, Russia, korokin@bsu.edu.ru

<sup>4</sup> PJSC Artgen Biotech  
Moscow, Russia, mail@genotarget.com

\*e-mail: ivan@ivan-ya.ru

**Keywords:** muscular dystrophy, dysferlinopathy, gene therapy, adeno-associated virus.

#### КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ, ДЕМОНСТРИРУЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *GBA* НА РАЗВИТИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Е.С. Яркова<sup>1,2\*</sup>, Е.В. Григорьева<sup>2</sup>, С.В. Павлова<sup>2</sup>, Д.А. Сорогина<sup>1,2</sup>, А.Е. Копытова<sup>3</sup>, Г.В. Байдакова<sup>4</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>4</sup>, С.Н. Пчелина<sup>3</sup>, С.М. Закиян<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН»  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

<sup>3</sup> ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики  
имени Б.П. Константинова Национального  
исследовательского центра «Курчатовский  
институт»  
188300, Гатчина, Орлова роща, 1

<sup>4</sup> ФГБНУ Медико-генетический научный центр  
115522, Москва, ул. Москворечье, 1

\*e-mail: e.drozдова2@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, дофаминергические нейроны, глюкоцереброзидаза, мутация p.N370S, амброксол.

Отсутствие эффективных методов лечения нейродегенеративных заболеваний ставит перед учёными проблему создания адекватных моделей, с помощью которых возможно провести скрининг лекарственных препаратов. Тормозят исследования мультифакторность болезней и ограничения в использовании животных моделей из-за различий в метаболизме ксенобиотиков. Разрешить эти затруднения позволили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), на основе которых возможно создание релевантных пациент-специфичных клеточных моделей.

Вторым по распространению нейродегенеративным заболеванием является болезнь Паркинсона (БП). Порядка 5–15% пациентов с БП имеют мутации в гене *GBA*, которые вызывают снижение активности фермента глюкоцереброзидазы (GCase), лизосомальную дисфункцию и накопление нейротоксичных агрегатов белка  $\alpha$ -синуклеина. Эти процессы индуцируют гибель дофаминергических (ДА) нейронов в компактной части чёрной субстанции.

В ходе работы нами проведена направленная дифференцировка линий ИПСК от двух пациентов-носителей генетического варианта p.N370S в гене *GBA* и двух здоровых доноров (контроль) в нейральные производные; изучены биохимические характеристики полученных клеточных культур [1,2]. В них наблюдается экспрессия маркёров, специфичных для зрелых ДА-нейронов (TH, LMX1A), которые составляют порядка 30% популяции. Также в культуре выявлена экспрессия маркёра астроглии S100 $\beta$ . Модель демонстрирует молекулярный фенотип мутации: в культуре носителей p.N370S отмечено снижение активности GCase относительно контроля.

На полученной модели было решено протестировать амброксол — потенциальный лекарственный препарат для БП, который находится на стадии клинических испытаний [3]. Амброксол повышает активность GCase и не оказывает влияния на экспрессию генов *GBA*, *TH* и *LMX1A*.

Примечательно, что разные клеточные культуры демонстрируют отличные друг от друга показатели как в экспрессии генов, так и в реакции на амброксол.

Кроме того, наблюдается тенденция к обратной зависимости уровней экспрессии *TH* и *GBA*: чем больше в культуре зрелых ДА-нейронов, тем ниже уровень *GBA*. Эти особенности культур могут значительно повлиять на интерпретацию результатов, поэтому необходимо детально изучать, как гетерогенность клеточной популяции влияет на исследуемые характеристики. Работа поддержана проектом Министерства образования и науки РФ № 075-15-2021-1063.

#### Литература

1. Grigor'eva EV, Drozdova ES, Sorogina DA et al. *Stem Cell Research*. 2022;59:102651.
2. Grigor'eva EV, Kopytova AE, Yarkova ES et al. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4437.
3. Mullin S, Smith L, Lee K et al. *JAMA Neurology*. 2020;77:427–434.

#### CELL MODELS THAT DEMONSTRATE THE EFFECT OF GENETIC VARIANTS OF THE GBA GENE ON THE DEVELOPMENT OF PARKINSON'S DISEASE

E.S. Yarkova<sup>1,2\*</sup>, E.V. Grigor'eva<sup>2</sup>, S.V. Pavlova<sup>2</sup>, S.P. Medvedev<sup>2</sup>, D.A. Sorogina<sup>1,2</sup>, A.E. Kopytova<sup>3</sup>, G.V. Baydakova<sup>4</sup>, E.Yu. Zakharova<sup>4</sup>, S.N. Pchelina<sup>3</sup>, S.M. Zakian<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Novosibirsk State University*

630090, Novosibirsk, st. Pirogova, 1

<sup>2</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences*

630090, Novosibirsk, Ac. Lavrentiev ave., 10

<sup>3</sup> *Petersburg Institute of Nuclear Physics named after B.P. Konstantinov National Research Center "Kurchatov Institute"*

188300, Gatchina, Orlova Grove, 1

<sup>4</sup> *Medical Genetic Research Center*

115522, Moscow, st. Moskvorechye, 1

\*e-mail: e.drozdova2@g.nsu.ru

**Keywords:** induced pluripotent stem cells, Parkinson's disease, dopaminergic neurons, glucocerebrosidase, p.N370S mutation, ambroxol.

## ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

### ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ YAP — СИГНАЛИНГА НА ПОЯВЛЕНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В ЭКВИВАLENTE ДЕРМЫ

Д.С. Аболин<sup>1,2\*</sup>, А.Д. Смыслов<sup>3</sup>,  
О.С. Роговая<sup>1</sup>, Е.П. Калабушева<sup>1</sup>,  
О.Л. Черкашина<sup>1</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН  
119334, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский химико-технологический университет  
им. Д.И. Менделеева  
125047, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова (МГУ)  
119991, Москва, Россия

\*e-mail: danilabolin@mail.ru

**Ключевые слова:** Фибробласты, дерма, фиброз, 3D-культивирование, YAP, YAP-сигналинг, вертепорфин.

Фибробласты дермы в ответ на повреждение реагируют увеличением пролиферации, секреции цитокинов и коллагена для быстрого закрытия дефекта. Механическая активация YAP/TAZ стимулирует экспрессию генов ранозаживления, что в патологии может привести к фиброзу и образованию келоида. Понимание клеточных и биохимических механизмов фиброза кожи позволит влиять на этот процесс и выявить мишени для его медикаментозного подавления. Эксперименты проводили в трехмерной модели дермы, которая представляет собой коллагеновый гель с заключенными в него дермальными фибробластами человека. Сигнальный каскад YAP/TAZ ингибировали вертепорфином. Количественный ПЦР-анализ показал значительное падение экспрессии как самих белков YAP и TAZ, так и их мишеней в течение 3х суток после обработки, что подтверждает ингибирование этого сигнального пути. Выявили, что добавление вертепорфина снижает интенсивность контракции коллагенового геля тотальной фракцией фибробластов, за счет исчезновения SM22 $\alpha$ -положительных сократительных клеток. В дальнейшем сравнили, какое влияние вертепорфин оказывает на отдельные фракции фибробластов дермы, в том числе на популяцию фибробластов рубца. Сравнение контракции коллагеновых гелей показал, что вертепорфин оказывает одинаковый ингибирующий эффект на все субпопуляции. При этом добавление вертепорфина не изменяло профиль экспрессии фибротических маркеров в исследуемых группах. Таким образом, вертепорфин подавляет экспрессию YAP и TAZ и ингибирует переход фибробластов в фиброзный фенотип в коллагеновом геле, однако точный механизм регуляции данного процесса требует дальнейшего изучения. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект 21-74-30015.

### INFLUENCE OF YAP-SIGNALING INHIBITION ON THE APPEARANCE OF THE CONTRACTIVE PHENOTYPE OF HUMAN FIBROBLASTS IN DERMAL EQUIVALENT

D.S. Abolin<sup>1,2\*</sup>, A.D. Smyslov<sup>3</sup>, O.S. Rogovaya<sup>1</sup>,  
E.P. Kalabusheva<sup>1</sup>, O.L. Cherkashina<sup>1</sup>, E.A. Vorotelak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Developmental Biology, N.K. Koltsov RAS  
119334, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Russian Chemical-Technological University named  
after D.I. Mendeleev  
125047, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University (MSU)  
119991, Moscow, Russia

\*e-mail: danilabolin@mail.ru

**Keywords:** Fibroblasts, dermis, fibrosis, 3D culture, YAP, YAP-signaling, verteporfin.

### ИНЪЕКЦИИ СЕМАГЛУТИДА АКТИВИРУЮТ АДИПОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С СД2Т

М.Ю. Агарёва<sup>1\*</sup>, Ю.С. Стафеев<sup>1</sup>, С.С. Мичурина<sup>1,2</sup>,  
Е.С. Зубкова<sup>1</sup>, Е.А. Шестакова<sup>3</sup>, А.О. Гаврилова<sup>3</sup>,  
М.С. Синеокая<sup>3</sup>, Е.И. Ратнер<sup>1</sup>, М.Ю. Меньшиков<sup>1</sup>,  
Е.В. Парфенова<sup>1,2</sup>, М.В. Шестакова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии имени  
академика Е.И. Чазова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова  
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр эндокринологии»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации  
117292, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11

\*e-mail: amarrgo1999@gmail.com

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, адипоциты, сахарный диабет 2 типа, свободные жирные кислоты, сокультивирование, сальник.

Агонисты рецептора глюкагонподобного пептида-1 (ГПП-1) используют при лечении сахарного диабета 2 типа (СД2Т) в течение последних 15 лет для снижения концентрации глюкозы в плазме, а также для снижения массы тела и защиты от сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что при СД2Т происходит нарушение многих функций мезенхимальных стволовых клеток (МСК), в том числе нарушается их адипогенная дифференцировка. При терапии СД2Т агонистами ГПП-1, например, семаглутидом, наблюдается снижение гипергликемии, гиперлипидемии, инсулинорезистентности и других факторов, способствующих развитию дисфункций МСК. В связи с этим, целью нашей работы является исследование влияния семаглутида на адипогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани человека.



Эксперимент проводили на МСК подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т до инъекций семаглутида и на МСК подкожной жировой ткани этих же доноров спустя 6 месяцев после инъекций. Клетки дифференцировали в белые и бежевые адипоциты в течение 21 дня по стандартному протоколу. Морфологию липидных капель оценивали с помощью флуоресцентного красителя BODIPY493/503. Содержание основного маркера адипогенеза FABP4, маркера воспаления pJNK-T183/Y185, tJNK и RAGE, а также маркера бежевой дифференцировки UCP-1 оценивали методом иммуноблоттинга.

В результате белого адипогенеза было обнаружено увеличение количества мелких капель, при анализе бежевого адипогенеза наблюдалось увеличение капель любого размера, а также содержание адипоцитов в поле зрения и маркера адипогенеза FABP4 увеличивалось после инъекций семаглутида как в случае белой, так и в случае бежевой дифференцировок. Экспрессия UCP1 увеличивалась в бежевых адипоцитах после инъекций семаглутида. Содержание pJNK-T183/Y185 снижалось в случае белой дифференцировки после инъекций семаглутида, а содержание RAGE снижалось и при белой, и при бежевой дифференцировках. Экспрессия основного маркера адипогенеза FABP4 возрастала в обоих случаях после инъекций семаглутида.

Таким образом, семаглутид усиливает адипогенез мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани человека как в бежевом, так и в белом направлениях, снижает экспрессию маркеров воспаления, а также увеличивает термогенную способность бежевых адипоцитов. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00365.

### SEMAGLUTIDE INJECTIONS ACTIVATE ADIPOGENIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM T2DM PATIENTS

M. Agareva<sup>1\*</sup>, I. Stafeev<sup>1</sup>, S. Michurina<sup>1,2</sup>,  
E. Zubkova<sup>1</sup>, E. Shestakova<sup>3</sup>, A. Gavrilova<sup>3</sup>,  
M. Sineokaya<sup>3</sup>, E. Ratner<sup>1</sup>, M. Menshikov<sup>1</sup>,  
Ye. Parfyonova<sup>1,2</sup>, M. Shestakova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Centre of Cardiology  
named after academician E.I. Chazov

121552, Moscow, st. 3rd Cherepkovskaya, 15a

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Leninskie Gory, 1

<sup>3</sup> Endocrinology Research Centre

117292, Moscow, st. Dmitry Ulyanov, 11

\* e-mail: amarrgo1999@gmail.com

**Keywords:** mesenchymal stem cells, adipocytes, type 2 diabetes mellitus, free fatty acids, cocultivation, omentum.

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ CD90<sup>+</sup> КЛЕТОК СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ

А.Д. Александрова<sup>1\*</sup>, А.О. Гайдамака<sup>1</sup>,  
Е.А. Воротеяк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова  
РАН

119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26.

\* e-mail: stadtrand@yandex.ru

**Ключевые слова:** строма и эпителий эндометрия, мезенхимные стволовые клетки (МСК), гетерогенность стромы эндометрия.

Эндометрий является внутренней оболочкой матки, содержащей люминальный и железистый эпителий, строму, сосуды и иммунные клетки. У человека функциональный слой эндометрия подвергается значительным изменениям в ходе менструального цикла, претерпевая стадии пролиферации, клеточной дифференцировки, отторжения и регенерации. Кроме того, он проходит преобразования в процессе беременности и родов. Для мыши характерен эстральный цикл, при котором не происходит отторжения ткани, однако эндометрий также проходит стадии восстановления и деградации [1].

Для обеспечения вышеперечисленных процессов необходим источник клеток, обеспечивающих регенерацию и функциональные изменения эндометрия. Предполагается, что эндометрий содержит пул эндометриальных МСК, которые могут участвовать в его ремоделировании. На настоящий момент известно несколько популяций клеток стромы эндометрия, обладающих свойствами МСК, однако их функциональное значение по большей части не известно [2].

В этой работе была обнаружена и изучена популяция клеток стромы эндометрия, положительная по одному из маркеров МСК — CD90. Данная популяция составляет 10–25% от всех клеток стромы эндометрия и располагается под люминальным эпителием, вокруг желез и сосудов. Мы обнаружили, что пул CD90<sup>+</sup> клеток истощается наполовину у мышей 8-недельного возраста относительно 4-недель. Также мы выявили в свежeweделенных CD90<sup>+</sup> клетках более низкий уровень экспрессии генов рецепторов к прогестерону (P4) и эстрадиолу (E2) относительно CD90<sup>+</sup> клеток.

Иммуноцитохимическое окрашивание культуры CD90<sup>+</sup> клеток показало, что 49% клеток положительно по маркеру пролиферации ki67, в то время как CD90<sup>+</sup> ki67<sup>+</sup> составляли 14%.

Нормальная регуляция репродуктивного цикла зависит от установления молекулярного диалога между эпителием и стромой. Мы оценили способность CD90<sup>+</sup> популяции к экспрессии генов, кодирующих факторы роста, участвующие в пролиферации эпителия. Экспрессия *Fgf10* и *Fgf18* была выше как в свежeweделенных CD90<sup>+</sup> клетках, так и при воздействии E2 в культуре.

Для установления беременности необходима децидуализация — дифференцировка стромы в клетки, участвующие в имплантации эмбриона. Мы показали, что CD90<sup>+</sup> клетки имеют более выраженную экспрессию гена, кодирующего пролактин, относительно CD90<sup>-</sup> клеток при культивировании с E2 и P4, что говорит о способности CD90<sup>+</sup> клеток к децидуализации *in vitro*.

Таким образом, CD90<sup>+</sup> популяция клеток стромы эндометрия участвует в паракринной регуляции гормон-зависимых процессов в эндометрии. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21–74–30015).

#### Литература

- Bertolin K, Murphy BD. Reproductive tract changes during the mouse estrous cycle. The guide to investigation of mouse pregnancy. 2014;85–94.
- Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. Hum Reprod Update. 2016;22(2):137–163.

## FUNCTIONAL IMPORTANCE OF THE CD90+ POPULATION OF MOUSE ENDOMETRIAL STROMA CELLS

A.D. Alexandrova<sup>1\*</sup>, A.O. Gaidamaka<sup>1</sup>, E.A. Vorotelyak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences  
119334, Moscow, 26 Vavilov Street

\*e-mail: stadtrand@yandex.ru

**Keywords:** endometrial stroma and epithelium, mesenchymal stem cells (MSCs), heterogeneity of the endometrial stroma.

## ВЫЯВЛЕНИЕ СРОКОВ РАЗВИТИЯ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ НА САМЦАХ И САМКАХ КРЫС

С.С. Андреева<sup>1,3\*</sup>, Е.К. Карсунцева<sup>1</sup>,  
А.Д. Воронова<sup>1,4</sup>, А.В. Чадин<sup>1</sup>,  
В.С. Шишкина<sup>1</sup>, Г.А. Фурса<sup>1,2</sup>, А.В. Федоров<sup>3</sup>,  
О.В. Степанова<sup>1,4</sup>, В.П. Чехонин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России  
119034, Москва, Кропоткинский переулок, д. 23, e-mail: info@serbsky.ru

<sup>2</sup> ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ  
119997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, e-mail: rsmu@rsmu.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, e-mail: info@mail.bio.msu.ru

<sup>4</sup> ФГБУ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ  
121522, Москва, ул. Академика Чазова, д.15а, e-mail: info@cardioweb.ru

\*e-mail: andretsova.svetlana@yandex.ru

**Ключевые слова:** моделирование болезни Альцгеймера, бета-амилоид, клеточная терапия, болезнь Альцгеймера, поведенческие тесты.

Болезнь Альцгеймера (БА) — тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое является самой частой причиной деменции. БА характеризуется внеклеточным отложением амилоидных бляшек, наличием нейрофибриллярных клубочков в нейронах, образованных скоплениями тау-белка и массовой гибелью нейронов [1]. На данный момент не существует эффективной стратегии лечения БА. Современные методы нацелены на облегчение симптомов и замедление прогрессирования болезни и не способствуют регенерации поврежденной нервной ткани [2]. Одним из перспективных методов лечения БА является клеточная терапия, при помощи которой могут быть восполнены утраченные нейроны и восстановлены нейронные связи. Моделирование БА на животных — необходимый этап для исследования безопасности и эффективности данного метода. Однако сроки развития БА при экспериментальном моделировании недостаточно изучены. Целью данной работы было выявление сроков развития БА при моделировании на самцах и самках крыс.

Исследования проводили на крысах линии Вистар в возрасте 4-х месяцев. Исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского МЗ РФ и выполнены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Животным билатерально вводили синтетический пептид 1-42 бета-амилоида в гиппокам

с помощью стереотаксиса. Развитие БА определяли с помощью оценки когнитивных нарушений, для чего применяли поведенческие тесты: «открытое поле», «У-лабиринт», тест на пассивное избегание, водный лабиринт Морриса.

Через 8 недель после введения бета-амилоида и у самцов, и у самок крыс наблюдали ухудшение памяти и способности ориентироваться в пространстве. Отмечали снижение кратковременной рабочей памяти и способности к обучению и запоминанию по сравнению с контрольной группой.

С помощью поведенческих тестов нами впервые было показано, что через 8 недель после введения 1-42 бета-амилоида развиваются признаки Альцгеймер-подобного состояния у самцов и самок крыс. Исследования на животных обоих полов необходимы, так как этому заболеванию подвержены как мужчины, так и женщины. Определение сроков развития заболевания дает возможность проведения экспериментальной клеточной терапии БА и получения данных для дальнейших трансляционных исследований у пациентов с БА. Работа была выполнена при поддержке РФФ (грант № 22-1500141).

### Литература

1. Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):107. doi: 10.3390/ijms24010107.
2. Passeri E, Elkhoury K, Morsink M et al. Alzheimer's disease: Treatment strategies and their limitations. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):13954. doi: 10.3390/ijms232213954.

## IDENTIFICATION OF THE DEVELOPMENT TIMING OF ALZHEIMER'S DISEASE SIGNS IN EXPERIMENTAL MODELING ON MALE AND FEMALE RATS

S.S. Andretsova<sup>1,3\*</sup>, E.K. Karsuntseva<sup>1</sup>,  
A.D. Voronova<sup>1,4</sup>, A.V. Chadin<sup>1</sup>,  
V.S. Shishkina<sup>1</sup>, G.A. Fursa<sup>1,2</sup>, A.V. Fedorov<sup>3</sup>,  
O.V. Stepanova<sup>1,4</sup>, V.P. Chekhonin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry  
119034, Moscow, 23, Kropotkiy lane

<sup>2</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University  
119435, Moscow, 1, Ostrovityanova Street

<sup>3</sup> Moscow State University  
119234, Moscow, 1-12, Leninskie Gory

<sup>4</sup> National Medical Research Center of Cardiology  
121522, Moscow, 15a, Academician Chazov Str.

\*e-mail: andretsova.svetlana@yandex.ru

**Keywords:** modeling of Alzheimer's disease, beta-amyloid, cell therapy, Alzheimer's disease, behavioral tests.

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ У КРЫС НА ФОНЕ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ ИНФУЗИИ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВО ВРЕМЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА И ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА

С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева\*

Научно-исследовательский институт кардиологии,  
Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук  
634012, Томск, ул. Киевская, 111а

\*e-mail: dina@cardio-tomsk.ru

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, постинфарктный кардиосклероз, Аллоплант, физическая толерантность к нагрузке, тест принудительное плавание.

Низкий регенеративный потенциал сердца не позволяет после инфаркта полноценно заменить погибшие кардиомиоциты новыми клетками. Одним из перспективных способов, повышающих репаративные процессы тканей, является инъекция биodeградируемого трансплантата Аллопланта. Этот биотрансплантант способствует восстановлению функционального и структурного состояния миокарда после инфаркта. Однако его влияние на толерантность к физическим нагрузкам практически не изучено. В связи с этим целью нашей работы было оценить толерантность к физической нагрузке крыс с постинфарктным кардиосклерозом на фоне инъекции бесклеточного материала Аллопланта.

Работа выполнена на половозрелых крысах линии Вистар. Инфаркт миокарда моделировали при помощи окклюзии левой нисходящей коронарной артерии или криодеструкции (КД) верхушки левого желудочка (ЛЖ) сердца. Инъекцию Аллопланта производили по периметру ЛЖ при коронароокклюзии (КО) и по периметру повреждения миокарда при КД. В работу включили группы: 1-ая — интактные животные; 2-ая — крысы с КО; 3-я — крысы с КД; 4-я — крысы, которым одновременно с КО проводили инъекцию аллопланта; 5-ая — крысы, которым трансплантировали аллоплант через 45 суток после КД. Крыс в эксперимент брали через 45 сут после интрамиокардиальной инъекции Аллопланта. Физическую работоспособность крыс в тесте принудительное плавание оценивали по длительности плавания с грузом 10% от массы тела при температуре воды 22 °С.

Результаты исследования показали, что крысы и контрольной, и опытных групп показали статистически значимо меньшую толерантность к физической нагрузке по сравнению со своими исходными показателями. При сравнении опытных групп с контролем оказалось, что в группах с Аллоплантом толерантность к физической нагрузке у крыс повышалась. Так, у крыс с КО и инъекцией Аллопланта физическая толерантность была выше контрольных значений на 31%. Повышение функциональной состоятельности сердца происходило и при инъекции Аллопланта после формирования постинфарктного кардиосклероза у крыс с КД. Толерантность к физической нагрузке у этих животных была выше контрольных значений на 69%.

Таким образом, Аллоплант способствует повышению толерантности к физической нагрузке при его применении как на стадии развития постинфарктного кардиосклероза, так и после его формирования.

#### EXERCISE TOLERANCE IN RATS ON THE BACKGROUND OF INTRAMIocardIAL INJECTION OF CELL-FREE MATERIAL DURING MYOCARDIAL INFARCTION AND AFTER THE DEVELOPMENT OF POSTINFARCTION CARDIOSCLEROSIS

S.A. Afanasiev, D.S. Kondratieva\*

*Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Academy Sciences of Russia*

634012, Tomsk, Kievskaya street, 111a

\*e-mail: dina@cardio-tomsk.ru

**Keywords:** myocardial infarction, postinfarction cardiosclerosis, alloplant, exercise tolerance, forced swim test.

#### НАНО- И МИКРОРАЗМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРИРОДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ПРОДИГИОЗИНА

Ф.С. Ахатова\*, И.Д. Гурьянов, Е.А. Науменко

*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18*

\*e-mail: akhatovaf@gmail.com

**Ключевые слова:** продигозин, нанотрубки галлуазита, микровезикулы, адресная доставка.

Традиционные химиотерапевтические методы лечения опухолевых заболеваний обладают существенными недостатками, связанными с отсутствием адресности доставки терапевтических агентов, низкой специфичностью воздействия применяемых лекарств и неспособностью препаратов преодолевать естественные тканевые и системные барьеры. Большинство противораковых препаратов токсичны для нормальных клеток [1], кроме того опухолевые клетки нередко проявляют устойчивость к химиотерапевтическим агентам [2]. В фокусе внимания исследователей всего мира находятся природные препараты, способные ингибировать пролиферацию раковых клеток и ограничивать развитие метастазов. Среди прочих соединений с подобными свойствами продигозин представляет отдельный интерес, поскольку его противоопухолевые свойства уже были подтверждены в ряде исследований [3].

На основе минеральных нанотрубок галлуазита нами в представленной работе были разработаны системы доставки продигозина с селективным воздействием в отношении линий раковых клеток *in vitro*. Было показано, что нормальные клетки, такие как фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки (МСК), в меньшей степени подвергаются негативному влиянию продигозина по сравнению с клетками линий Saso2 и HCT116. С привлечением флуоресцентной и усиленной темнопольной микроскопии было показано распределение наноконтейнеров с продигозином внутри клеток.

Далее нами был разработан метод получения искусственных микровезикул из МСК как наиболее биосовместимой формы доставки продигозина в раковые клетки. Полученные микровезикулы были визуализированы методами микроскопии высокого разрешения (атомно-силовой, усиленной темнопольной). При воздействии полученных везикул на малигнизированные и нормальные линии клеток наблюдался выраженный селективный эффект в отношении раковых клеток *in vitro*. Концентрация продигозина в составе везикул, достаточная для проявления цитотоксического эффекта в отношении малигнизированных клеток, была значительно ниже, чем при использовании нанотрубок галлуазита в качестве носителей. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-25-00334.

#### Литература

- Amreddy N, Babu A, Muralidharan R et al. Advances in nanoparticle-based cancer drug and gene delivery. *Advances in Cancer Research*. 2018;137:115–170. doi: 10.1016/bs.acr.2017.11.003.
- Ni W, Li Z, Liu Z et al. Dual-targeting nanoparticles: co-delivery of curcumin and 5-fluorouracil for synergistic treatment of hepatocarcinoma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(3):1284–1295. doi: 10.1016/j.xphs.2018.10.042.
- Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodiogosin through inhibition of tumor invasion. *Biochemical Pharmacology*. 2005;69(3):407–414. doi: 10.1016/j.bcp.2004.08.037.

## NANO- AND MICRO-SIZED CARRIERS FOR TARGETED DELIVERY OF THE NATURAL ANTITUMOR DRUG PRODIGIOSIN

F.S. Akhatova\*, I.D. Guryanov, E.A. Naumenko

Kazan (Volga Region) Federal University  
420008, Kazan, Kremlevskaya, 18

\* e-mail: akhatovaf@gmail.com

**Keywords:** prodigiosin, halloysite nanotubes, microvesicles, targeted delivery.

## АЛКАНСУЛЬФОНИЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ ГИДОВОЙ РНК

Е.А. Ахметова<sup>1\*</sup>, О.В. Сергеева<sup>1</sup>, Т.С. Зацепин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий  
121205, Москва, Большой бульвар, 30/1

<sup>2</sup> Московский государственный университет,  
химический факультет  
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

\* e-mail: elizaveta.akhmetova@skoltech.ru

**Ключевые слова:** модификация гидовой РНК.

Химическая модификация является стандартным методом улучшения биохимических свойств терапевтических олигонуклеотидов. С целью повышения стабильности олигонуклеотидов широко используются такие модификации, как 2'-OMe, 2'-F и тиофосфаты. Недавно в качестве перспективных аналогов тиофосфатов был предложен ряд N-(алкансульфонил)-фосфорамидов [1]. Антигеновые олигонуклеотиды, содержащие метансульфонильные группы, показали повышенную устойчивость к нуклеазам, сниженную иммуногенность и цитотоксичность, а также повысили уровень локализации в ядре по сравнению с тиофосфатными аналогами [2].

Мы впервые получили гидовые РНК для CRISPR/Cas9 системы, содержащие N-метансульфонильные и N-бутансульфонильные группы. На основе скрининга библиотек sgРНК с одиночными модификациями был проведен дизайн и синтез мультимодифицированных гидовых РНК к двум терапевтическим мишеням: pсsk9 (пропротеиновая конвертаза) и hbb (β субъединица гемоглобина). Комбинация нескольких алкансульфонильных групп улучшила стабильность гидовых РНК в клеточной среде, а также повысила эффективность расщепления модельных ДНК-субстратов *in vitro*. Максимальный процент алкансульфонильных модификаций в ДНК-связывающей области гидовой РНК при незначительном снижении активности CRISPR-системы составил 75%. Гидовые РНК были также протестированы в комплексе с высокоспецифичными вариантами Cas9. Комбинация с мутантными эндонуклеазами не снизила эффективности расщепления ДНК-мишеней. Мы предполагаем, что совместное использование модифицированных РНК и высокоточных форм белка Cas9 позволит улучшить как эффективность, так и селективность расщепления CRISPR/Cas9 системы.

Таким образом, алкансульфонильные модификации выступают перспективными аналогами тиофосфатов, в том числе и в составе гидовой РНК для CRISPR/Cas9 системы.

### Литература

1. Burakova EA, Derzhalova AS, Chelobanov BP et al. New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2019;45:662–668.

2. Anderson BA, Freestone GC, Low A et al. Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides. Nucleic Acids Research. 2021;49(16):9026–9041.

## АЛКАНСУЛЬФОНИЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ РУКОВОДНОЙ РНК

Е.А. Ахметова<sup>1\*</sup>, О.В. Сергеева<sup>1</sup>, Т.С. Зацепин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий  
121205, Москва, Большой бульвар, 30, блд. 1

<sup>2</sup> Московский государственный университет,  
факультет химии  
119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

\* e-mail: elizaveta.akhmetova@skoltech.ru

**Keywords:** modification of guide RNA.

## БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ ПРОКАРИОТ КАК СЕНСОРЫ МОДИФИКАЦИЙ ДНК

М.А. Бескровная<sup>1,2,3\*</sup>, А.А. Агапов<sup>2</sup>,  
Д.М. Есюнина<sup>1,2</sup>, А.В. Кульбачинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН  
119334, Москва, улица Вавилова, д. 34/5

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

<sup>3</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова  
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\* e-mail: martynenko\_margo@mail.ru

**Ключевые слова:** программируемые нуклеазы, белки-аргонавты, модификации ДНК.

Белки-аргонавты — металл-зависимые эндонуклеазы, которые используют короткие гидовые олигонуклеотиды для внесения одноцепочечных разрывов в мишень, комплементарную этим гидам. Их можно обнаружить у эукариот, архей и бактерий [1]. У прокариот они задействованы в системе защиты от чужеродных нуклеиновых кислот [2,3]. Способность специфично расщеплять мишень делает белки-аргонавты интересными с точки зрения поиска потенциально новых инструментов геномной инженерии [4]. Изучение влияния нуклеотидных модификаций в мишени и гида важно для их применения в качестве программируемых нуклеаз и сенсоров для детекции повреждений в ДНК.

В нашей работе исследовано влияние 6 модификаций в ДНК-мишени (О6-метилгуанин, 8-оксогуанин, 1,N<sup>6</sup>-этноаденин, тимингликоль, тиминового димера, тиофосфатная связь) на эффективность работы белков-аргонавтов разных групп, связывающих ДНК или РНК-гиды. Показано, что модификации по-разному влияют на расщепление мишени в зависимости от своего положения относительно сайта расщепления и от использованного белка-аргонавта. Наибольшее снижение эффективности расщепления наблюдается для модификаций, находящихся на расстоянии 1–2 нуклеотида от места расщепления. Модификации гидовой молекулы (Cu3, LNA) в некоторых положениях приводят к снижению эффективности расщепления мишени белками-аргонавтами. В частности, остаток Cu3, расположенный на 5'-конце гида, оказывает негативное влияние на процессинг мишени.

Преимущественная элиминация немодифицированной ДНК исследованными белками-аргонавтами может

быть использована для разработки новых методов детекции модификаций в ДНК-мишенях. Модификации гидов могут быть использованы для повышения их стабильности в биологических системах и для разработки методов визуализации комплементарных мишеней с использованием белков-аргонавтов. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение 075-15-2021-1062).

#### Литература

1. Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA. The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins. *mBio*. 2018;9(6):e01935-18. doi: 10.1128/mBio.01935-18.
2. Kuzmenko A, Oguienko A, Eyunina D et al. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature*. 2020;587(7835):632–637. doi: 10.1038/s41586-020-2605-1.
3. Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R et al. Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell*. 2013;51:594–605. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.014.
4. Kropocheva EV, Lisitskaya LA, Agapov AA et al. Prokaryotic Argonaute proteins as a tool for biotechnology. *Mol Biol*. 2022;56:854–873. doi: 10.1134/S0026893322060103.

### PROKARYOTIC ARGONAUTE PROTEINS AS SENSORS OF DNA MODIFICATIONS

M.A. Beskrovnaia<sup>1,2,3\*</sup>, A.A. Agapov<sup>2</sup>,  
D.M. Eyunina<sup>1,2</sup>, A.V. Kulbachinskiy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, str. Vavilov, 34/5

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute"

123182, Moscow, Kurchatov sq., 2

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University

119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1/12

\*e-mail: martynenko\_margo@mail.ru

**Keywords:** programmable nucleases, Argonaute proteins, DNA modifications.

### СЕКМЕНТЫ, ОТДАЛЕННЫЕ ОТ ЭПИЦЕНТРА ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

A.P. Bilalova<sup>1\*</sup>, A.V. Timofeeva<sup>1</sup>, I.M. Kabdesh<sup>1</sup>,  
Y.O. Mukhamedshina<sup>1,2</sup>, Y.A. Chelyshev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

420012, Казань, ул. Бултерова, д. 49

\*e-mail: bilalovaaizilya19@gmail.com

**Ключевые слова:** травма спинного мозга, внеклеточный матрикс, протеогликаны, нейрорегенерация.

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к дегенерации двигательных и чувствительных нейронов ниже области повреждения, восстановление которых остается трудноразрешимой проблемой. Среди клеточных и молекулярных изменений в удаленной области, а именно поясничного отдела спинного мозга, где сосредоточен центральный генератор паттерна, особое внимание

уделяется компонентам внеклеточного матрикса (ВКМ), в частности, протеогликанам различных классов, которые выступают в роли ингибиторов пластичности и нейрорегенерации. Данных по молекулярной организации ВКМ в отдаленной области недостаточно, что определяет актуальность подобных исследований.

В ходе исследования была установлена экспрессия мРНК генов молекул ВКМ *Acan*, *Vcan*, *Vcan*, *Gpc6*, *Gpc4*, *NG2*, *TnR* в вентральных рогах поясничного утолщения (L3-L4) интактного и травмированного на уровне грудного отдела (Th8) спинного мозга на 7 и 60 сутки после повреждения. В качестве групп сравнения был аналогичным образом проанализирован интактный и травмированный спинной мозг в области, приближенной к эпицентру повреждения, на уровне 10 грудного сегмента (Th10).

Уровень экспрессии мРНК гена *Acan* достоверно снижался на 7 (острый период ТСМ) и 60 (хронический период ТСМ) сутки после повреждения в области Th10. Несмотря на значительное расстояние от эпицентра повреждения, на уровне L3-4 также происходило достоверное снижение экспрессии мРНК гена *Acan* на 7 и 60 сутки после ТСМ при сравнении с интактным спинным мозгом, для которого было отмечено повышение ( $P < 0,05$ ) данного показателя в L3-4 при сравнении с Th10. Достоверное изменение в экспрессии мРНК гена *Gpc6* наблюдалось на уровне L3-4: в интактной группе экспрессия данного показателя была выше в 1,6 и 2,2 раз при сравнении с 7 и 60 сутками, соответственно. Достоверное изменение в экспрессии мРНК гена *TnR* было обнаружено на 7 и 60 сутки после повреждения в области L3-4, а также на 60 сутки в области Th10 при сравнении с 7 сутками. Наше исследование показало, что экспрессия мРНК гена *Gpc4* и *NG2* не претерпевает значительных изменений при моделировании ТСМ в острый и хронический период в области приближенной и удаленной от эпицентра повреждения. Уровень экспрессии мРНК генов *Vcan*, *Vcan* на 60 сутки после повреждения в области Th10 был выше по сравнению с областью L3-4, также было обнаружено достоверное снижение данного показателя в интактном спинном мозге и на 7 сутки после ТСМ при сравнении Th10 и L3-4 для *Vcan*.

Эти результаты расширяют представление о молекулярных и клеточных механизмах патологических изменений в отдаленных от эпицентра ТСМ сегментах для поиска и обоснования перспективных терапевтических мишеней. Кроме того, полученные данные дают обоснование терапевтической эффективности воздействий не только непосредственно на первичную область повреждения, но и на отдаленные отделы спинного мозга.

### SEGMENTS DISTANT FROM THE EPICENTER OF TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY ARE A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET

A.R. Bilalova<sup>1\*</sup>, A.V. Timofeeva<sup>1</sup>, I.M. Kabdesh<sup>1</sup>,  
Y.O. Mukhamedshina<sup>1,2</sup>, Y.A. Chelyshev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kazan Federal University

420008, Kazan, st. Kremlin, 18

<sup>2</sup> Kazan State Medical University

420012, Kazan, st. Butlerova, 49

\*e-mail: bilalovaaizilya19@gmail.com

**Keywords:** spinal cord injury, extracellular matrix, proteoglycans, neuroregeneration.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ БИБЛИОТЕКИ GPI-ЗАЯКОРЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА В ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТАХ

С.Е. Боровикова<sup>1\*</sup>, Н.А. Круглова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

\*e-mail: borovikova\_sofiya@mail.ru

**Ключевые слова:** вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), ингибиторы слияния, нокин, библиотека пептидов.

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается острой социальной проблемой для всего человечества. Перспективным подходом к лечению ВИЧ инфекции является генная терапия. Одна из стратегий модификации генома — встраивание конструкций, кодирующих заякоренные на мембране пептидные ингибиторы слияния ВИЧ. Такие ингибиторы блокируют слияние клеточной и вирусной мембран и препятствуют проникновению ВИЧ внутрь клеток.

Одним из ингибиторов слияния является пептид 2P23. Ранее в нашей лаборатории была разработана конструкция для поверхностной экспрессии пептидных ингибиторов слияния, в том числе с 2P23, в которой пептид включен в состав короткой GPI-заякоренной молекулы CD52 [1]. Однако при встраивании конструкции с 2P23 в геном клеток с помощью системы CRISPR/Cas9 уровень пептида на мембране был низким. Было выдвинуто предположение, что, модифицируя последовательности аминокислот на N- и C-концах пептида, можно добиться увеличения уровня пептида на клеточной поверхности.

Для поиска высокоэкспрессирующихся вариантов была создана библиотека с тремя рандомизированными аминокислотами с N- и C-конца пептида 2P23. Для этого был заказан синтез олигонуклеотидов, один из которых содержал рандомизированные участки с NNK-повторами, где N — любой нуклеотид, а K — G или T. Олигонуклеотиды отжигали, достраивали и проводили низкоцикловую ПЦР-амплификацию с внешними праймерами. Далее ПЦР-продукт клонировали в плазмидный лентивирусный вектор. Полученную библиотеку плазмид использовали для наработки псевдовиральных частиц, которыми заражали клоны модифицированных культур HEK 293T/CD4/CCR5 и SEM/CCR5. После трансдукции клетки окрашивали антителами против 2P23 и оценивали уровень экспрессии пептида на поверхности с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки с экспрессирующейся на поверхности библиотекой пептидов были подвергнуты нескольким раундам сортировки и протестированы в вирусологических тестах с реплицирующимся вирусом ВИЧ-1. Из клеток до и после вирусологической селекции была выделена геномная ДНК, с неё получен ПЦР-продукт, который отправлен на NGS.

В последующем с помощью биоинформатического анализа данных секвенирования будут определены последовательности пептидов с повышенной экспрессией и потенциально улучшенными защитными свойствами. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00381).

### Литература

- Maslennikova A, Kruglova N, Kalinichenko S et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41. *mBio*. 2022;13(1):e0358921. doi: 10.1128/mbio.03589-21.

## DESIGN AND OPTIMIZATION OF THE LIBRARY OF GPI-ANCHORED PEPTIDES FOR SCREENING IN VIROLOGICAL TESTS

S. Borovikova<sup>1\*</sup>, N. Kruglova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology  
119334, Moscow, 34/5 Vavilova Street

\*e-mail: borovikova\_sofiya@mail.ru

**Keywords:** human immunodeficiency virus (HIV), fusion inhibitors, knock-in, peptide library.

## ПРОФИБРОТИЧЕСКОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ИНДУЦИРУЕТ НЕТИПИЧНУЮ СЕНЕСЦЕНЦИЮ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

М.А. Виговский<sup>1,2\*</sup>, Н.А. Басалова<sup>1</sup>,  
У.Д. Дьячкова<sup>1,2</sup>, М.С. Арбатский<sup>2</sup>,  
В.С. Попов<sup>1,2</sup>, А.Е. Толстолужинская<sup>1,2</sup>,  
О.А. Григорьева<sup>1</sup>, А.Ю. Ефименко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова

119192, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10

<sup>2</sup> Кафедра биохимии и молекулярной медицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

119991, Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

\*e-mail: vigovskiy\_m.a@mail.ru

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, внеклеточные везикулы, фиброз, индуцированная сенесценция.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выступают важнейшими регуляторами процессов репарации и регенерации постнатальных тканей. Во многих исследованиях была показана способность секретомы МСК, в том числе фракции внеклеточных везикул (ВВ), предотвращать развитие фиброза в ответ на повреждение. Но в условиях уже развивающегося фиброза ткани за счет таких важнейших компонентов, как свободный трансформирующий фактор роста TGF $\beta$  и ремоделированный внеклеточный матрикс (ВКМ), местные МСК могут утрачивать свой антифибротический потенциал, приобретая при этом признаки сенесцентных клеток.

Профибротическое микроокружение, моделируемое культивированием МСК на внеклеточном матриксе фибробластов (ВКМ) с добавлением TGF $\beta$ , приводило к значительным изменениям транскрипционного профиля, оцененного методом анализа транскриптома единичных клеток. Так, по сравнению с контролем, в профибротических условиях уровень мРНК ингибиторов клеточного цикла поднимался в 4–25 раз, циклинзависимых киназ снижался в 3–15 раз, ядерного ламинаВ1 — в 14 раз, а также значительно менялись уровни транскриптов ферментов, отвечающих за эпигенетический профиль, что подтверждалось совпадением части генов из базы данных CellAge. Активность генов CDKN1C (p57), CDKN2A (P16-INK4A) и IGFBP3 из списков изменяющихся при старении генов подтвердили методом RT-PCR для валидации результатов биоинформатического анализа. Окрашивание SA- $\beta$ -Gal также подтверждало индукцию профибротическим окружением сенесценции МСК, в то время как пролиферативная активность клеток в таких условиях была значительно выше, чем при добавлении известного индуктора сенесценции, перекиси водорода, и сравнима с контролем. При этом количество p21+ клеток возрастает в половине образцов в 6–17 раз, но в половине

снижается почти в 2 раза в профибротических условиях по сравнению с контролем, а анализ компонентов секрета, ассоциированного со старением (SASP) выявил снижение уровня секреторируемого IL6 в 6–10 раз, MCP-1 в 5–55 раз и повышение PAI-1 в 1,5–4, при этом соответствия между изменениями p21 и SASP не наблюдалось. В то же время вне зависимости от накопления перечисленных маркеров сенесценции ВВ МСК, культивированных в профибротических условиях, утрачивали способность подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что индукция профибротическим микроокружением вызывает развитие нетипичного фенотипа клеточной сенесценции, при которой проявляется только часть канонических маркеров, но при этом происходит значимое снижение антифибротических регуляторных свойств МСК. Исследование было выполнено при поддержке РФФИ (№ 19-29-04172).

### PROFIBROTIC MICROENVIRONMENT INDUCES ATYPICAL SENESCENCE OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

M.A. Vigovsky<sup>1,2\*</sup>, N.A. Basalova<sup>1</sup>, U.D. Dyachkova<sup>1,2</sup>, M.S. Arbatsky<sup>2</sup>, V.S. Popov<sup>1,2</sup>, A.E. Tolstoluzhinskaya<sup>1,2</sup>, O.A. Grigoryeva<sup>1</sup>, A.Yu. Efimenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University  
119192, Moscow, Lomonosovsky pr-t., 27, bldg. 10

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University  
119991, Moscow, Lomonosovsky pr-t., 27, bldg. 1

\*e-mail: vigovskiy\_m.a@mail.ru

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, extracellular vesicles, fibrosis, induced senescence.

### EX VIVO МЕТОД В ХАРАКТЕРИСТИКЕ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

M.C. Гилева<sup>1\*</sup>, Е.Г. Уфимцева<sup>2</sup>, В.В. Козлов<sup>3</sup>, Л.Ф. Гуляева<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины  
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>3</sup> Новосибирский областной клинический онкологический диспансер  
630108, Новосибирск, ул. Плахотного, 2

\*e-mail: gileva.rita@gmail.com

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома, плоскоклеточный рак легкого, маркеры, иммунное микроокружение опухоли, PD-L1.

Рак легкого в 2020 году занял второе место по выявлению новых случаев в мире и стал наиболее распространенной причиной смерти от онкологических заболеваний. В Российской Федерации по заболеваемости рак легкого занимает первое место среди других злокачественных опухолей у мужчин, а по смертности — 1-е место среди и мужчин, и женщин [1]. Подавляющее большинство случаев рака легкого приходится на его немелкоклеточный вариант (НМРЛ, 85%), среди которого чаще встречаются аденокарцинома (40%) и плоскоклеточный рак легкого

(ПКРЛ, 25%). Важно различать эти подтипы из-за их отличающихся характеристик, схем терапии и исхода [1, 2]. Следовательно, необходим точный анализ клеток злокачественного новообразования пациента.

С этой целью мы разработали ex vivo метод для характеристики как клеток опухоли, так и ее иммунного микроокружения, и впервые использовали для анализа клеток из образцов НМРЛ (аденокарцинома — 8 пациентов и ПКРЛ — 4 пациента) и неопухолевой ткани легкого тех же пациентов после операций на базе НОКОД. Полученные ex vivo цитологические и параллельно гистологические препараты были исследованы по методу Романовского-Гимза и с использованием специфических антител к маркерам опухоли: CK7, TTF1, PanCK, p40, Ki-67, AhR, AhRR, CYP1A1, PD-L1 — и клеткам иммунитета: CD14, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL4, IL10, FGFb, PD-1.

Для образцов НМРЛ наиболее значимым стало исследование ex vivo методом экспрессии PD-L1, оценка которой необходима для назначения иммунотерапевтического лечения. На всех гистологических срезах образцов НМРЛ, исследованных в работе, экспрессии PD-L1 раковыми клетками не обнаружили, однако при анализе ex vivo цитопрепаратов, полученных из всего пула ткани опухолей, для образцов ПКРЛ 1 и 3 выявили экспрессию PD-L1 раковыми клетками с индексом TPS 10% и 2%, соответственно. Другие исследованные маркеры не показали специфичности для клеток аденокарцином и ПКРЛ, следовательно, их поиск необходимо продолжить. Состав и количество опухоль-ассоциированных клеток иммунного ответа были индивидуальны для каждого пациента с НМРЛ. Для всех образцов НМРЛ выявили активацию опухоль-ассоциированных макрофагов, что важно учитывать при проведении иммунотерапии.

Таким образом, разработанный ex vivo метод позволяет в короткие сроки дифференцировать как подтип опухоли, так и охарактеризовать раковые клетки и клетки иммунного микроокружения по составу и экспрессии ими различных маркеров. Исследование проводилось с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ФТМ «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691), и поддержано грантом РНФ № 22-15-00065.

#### Литература

1. Lung cancer: guide. Gantsev SH, Hmelevsky AA, editors. Moscow: GEOTAR- Media, 2020. (In Russ).
2. Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy in lung cancer. Surgical Pathology Clinics. 2020;13(1):17–33.

### EX VIVO CHARACTERISTICS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS

M.S. Gileva<sup>1\*</sup>, E.G. Ufimtseva<sup>2</sup>, V.V. Kozlov<sup>3</sup>, L.F. Gulyaeva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, 1 Pirogova street

<sup>2</sup> Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine  
630117, Novosibirsk, 2 Timakova street

<sup>3</sup> Novosibirsk Regional Clinical Oncology Dispensary  
630108, Novosibirsk, 2 Plahotny street

\*e-mail: gileva.rita@gmail.com

**Keywords:** non-small cell lung cancer, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, biomarkers, tumor microenvironment, PD-L1.

## ВЛИЯНИЕ ВЕРТЕПОРФИНА НА YAP+ КЛЕТКИ ОРГАНОИДОВ ПОСТНАТАЛЬНЫХ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ

И.А. Говорова\*, О.И. Сутягина,  
С.Ю. Никиточкина, Е.А. Воротеляк

ФГБУН Институт биологии развития им.  
Н.К. Кольцова РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

\*e-mail: ischenko.i.a@gmail.com

**Ключевые слова:** органоиды легких, YAP, вертепорфин, пролиферация.

Транскрипционные факторы YAP/TAZ и их внутриклеточная локализация играют важную роль в нормальном развитии и функционировании легких млекопитающих, в частности влияют на пролиферацию, дифференциацию клеток, процессы регенерации, канцерогенеза [1]. Вертепорфин (ВТП) является ингибитором, блокирующим взаимодействие YAP-TEAD в ядре клетки, что приводит к снижению активности генов-мишеней YAP [2]. Однако механизмы, контролирующие внутриклеточную локализацию YAP и его функционирование в клетках монослойной культуры на пластике и в составе органоидов, не идентичны [3]. В работе исследовано влияние ВТП на пролиферативную способность и выживаемость тотальной фракции и мезенхимных YAP+ клеток в составе органоидов легких мыши.

Клетки были выделены из легких мышей P7 линии C57Bl/6. Легкие были перфузированы, интратрахеально заполнены диспазой (50U/ml) и инкубированы с коллагеназой IV типа (1000 U/ml). Клетки ресуспендировали с GFR Matrigel (1:1) и вносили во вставки Transwell. Органоиды культивировали в течение 14 сут в присутствии контрольной среды и с ВТП (1 мкМ) — 10 сут., после чего органоиды были диссоциированы из матригеля. Часть полученной клеточной суспензии была окрашена антителами против YAP, Vimentin (мезенхима) и DAPI, затем проанализирована методом проточной цитофлуориметрии. Кроме того, часть клеток была проанализирована методом ПЦР.

ПЦР анализ не выявил уменьшение экспрессии генов YAP/TAZ для органоидов контроля и в присутствии ВТП, однако показал достоверное снижение экспрессии генов-мишеней YAP *Ccn1*, *Ccn2* в клетках при воздействии ВТП. Проточная цитофлуориметрия показала, что доля YAP+ клеток сопоставима в контроле и при воздействии ВТП, как для тотальной фракции (51,05% в контроле, 52,55% под ВТП), так и для мезенхимы (74,15% в контроле и 83,05% под ВТП). Пролиферативная активность мезенхимных клеток в составе органоидов в присутствии ВТП (доля клеток в фазе G2 — 7,6%) достоверно снижается по сравнению с контролем (15,1%), для тотальной фракции клеток также выявлено снижение (14,5% и 9,2%, соответственно). Показано, что в клетках органоидов с ВТП, гибнущих клеток значительно больше (11,8%), по сравнению с контролем (3,2%). Таким образом, показано влияние ВТП на YAP сигналинг, пролиферативную активность и на выживаемость клеток органоидов легких мыши при неизменном уровне экспрессии YAP и TAZ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30015).

### Литература

1. Tang W, Li M, Yangzhong X. et al. Hippo signaling pathway and respiratory diseases. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):213.

2. Wang C et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 $\sigma$  sequestering YAP in the cytoplasm. *American Journal of Cancer Research.* 2015;6(1):27–37.
3. Silva-Pedrosa R, Salgado AJ, Ferreira PE. Revolutionizing disease modeling: The emergence of organoids in cellular systems. *Cells.* 2023;12(6):930.

## THE INFLUENCE OF VERTEPORFIN ON ORGANOID YAP+ CELLS IN MOUSE POSTNATAL LUNGS

I.A. Govorova\*, O.I. Sutyagina,  
S.Y. Nikitochkina, E.A. Vorotelyak

N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian  
Academy of Sciences  
119334, Moscow, Vavilov str, 26

\*e-mail: ischenko.i.a@gmail.com

**Keywords:** lungs organoids, YAP1, verteporfin, proliferation.

## ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ FLNC-АССОЦИИРОВАННОЙ РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ МЕТОДОМ ПРАЙМИРОВАННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Д.В. Голиусова<sup>1,2\*</sup>, М.Ю. Шарикова<sup>1</sup>,  
И.В. Копылова<sup>1</sup>, М.В. Терякова<sup>1</sup>,  
О.С. Лебедева<sup>1,3</sup>, А.Н. Богомазова<sup>1,3</sup>,  
М.А. Лагарькова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр  
физико-химической медицины имени академика  
Ю.М. Лопухина Федерального медико-  
биологического агентства  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова  
РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>3</sup> Центр высокоточного редактирования  
и генетических технологий для биомедицины ФНЦК  
ФХМ им. Ю.М. Лопухина  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

\*e-mail: daria.goliusova@mail.ru

**Ключевые слова:** праймированное редактирование, изогенная клеточная модель, индуцированные плюрипотентный стволовые клетки (ИПСК), ген *FLNC*, рестриктивная кардиомиопатия.

В отличие от классической CRISPR/Cas9 системы редактирования генома система праймированного редактирования (prime editing, PE), разработанная в 2019 году [1], основана на внесении одноцепочечного разрыва в ДНК каталитически дефектной нискозой Cas9 *S. pyogenes*, сшитой с ревертазой MMLV, синтезирующей в месте разрыва желаемую последовательность нуклеотидов путем обратной транскрипции на матрице специальной гидовой РНК (pegRNA). pegRNA одновременно содержит сайт связывания с целевым локусом ДНК и последовательность желаемой вставки. Эффективность метода сопоставима или ниже таковой по сравнению с CRISPR/Cas9, однако главным его преимуществом является низкий процент офф-таргет эффектов по сравнению с редактированием, основанным на гомологичной рекомбинации [1]. Главное ограничение метода — большой вес



генетических конструкций (17–18 kb), затрудняющий их доставку в клетки. Тем не менее PE-система имеет широкий спектр возможностей редактирования, в связи с чем потенциально позволяет корректировать до 89% генетических заболеваний человека [2]. Ранее в лаборатории нами были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) пациента с недавно описанной [3] патогенной гетерозиготной миссенс-мутацией с.7416\_7418delGAA гена филamina C (*FLNC*). Такая делеция трех нуклеотидов (GAA) приводит к ранней манифестации рестриктивной кардиомиопатии — орфанной неизлечимой патологии миокарда с неизвестным патогенезом [4]. Данная работа представляет результаты сборки и применения системы редактирования PE для коррекции и интродукции исследуемой мутации гена *FLNC* в ИПСК пациента и ИПСК неродственного здорового донора, соответственно. В дальнейшем все линии ИПСК будут дифференцированы в кардиомиоциты для изучения молекулярно-генетических механизмов развития *FLNC*-ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии в полученной двойной изогенной клеточной модели заболевания. Коллектив выражает благодарность МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова за предоставление плазмиды pCMV-PE2-P2A-GFP (Addgene #132776). Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-00456).

#### Литература

1. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR et al. Search-and-replace genome editing without double strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576:149–157.
2. Zhao Z, Shang P, Mohanraju P, Geijsen N. Prime editing: advances and therapeutic applications. *Trends Biotechnol*. 2023;41(8):1000-1012.
3. Gabbin B. Modeling of a novel filamin-C mutation in restrictive cardiomyopathy using hiPSC-derived cardiomyocytes [master thesis]. University of Applied Sciences Technikum Wien. 2020. Available from: <https://www.marshallplan.at/images/All-Papers/MP-2020/Gabbin+Beatrice+1012.PDF>.
4. Song S, Shi A, Lian H et al. Filamin C in cardiomyopathy: from physiological roles to DNA variants. *Heart Fail Rev*. 2022;27:1373–1385.

#### GENERATION OF A *FLNC*-ASSOCIATED RESTRICTIVE CARDIOMYOPATHY ISOGENIC CELL MODEL VIA PRIME EDITING

D.V. Goliusova<sup>1,2\*</sup>, M.Y. Sharikova<sup>1</sup>,  
I.V. Kopylova<sup>1</sup>, M.V. Teryakova<sup>1</sup>, O.S. Lebedeva<sup>1,3</sup>,  
A.N. Bogomazova<sup>1,3</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

<sup>2</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, Vavilova Street, 26

<sup>3</sup> Center of Precise Editing and Genetic Technologies for Biomedicine

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

\*e-mail: daria.goliusova@mail.ru

**Keywords:** prime editing, isogenic cell model, induced pluripotent stem cells (iPSCs), *FLNC* gene, restrictive cardiomyopathy.

#### ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПОЗИТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ АТОМАМИ ЦИНКА И/ИЛИ ГАЛЛУАЗИТОМ

A.B. Горохова<sup>1\*</sup>, Е.Д. Порохова<sup>1</sup>,  
Т.Ф. Насибов<sup>1</sup>, А.Н. Дзюман<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
634050, Томск, Московский тракт, 2

\*e-mail: a.gorokhova3062@gmail.com

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, биоинженерия кости, медицинское материаловедение.

Цинк является важным микроэлементом для дифференцировки клеток, а также формирования и роста костей. Для придания особых свойств костным имплантатам с кальцийфосфатным покрытием (КФП) часто используют замещение ионов кальция в их структуре на цинк [1].

Целью исследования стало изучение остеогенного потенциала композитных имплантатов с КФП, модифицированными атомами Zn и/или галлуазитом.

В эксперименте использовались титановые каркасы, изготовленные на базе ООО «НПК «СИНТЕЛ» (Томск) путем 3D-печати. На каркасы наносили микродуговое КФП из стехиометрического гидроксиапатита (ГАП), а также его модификаций: ГАП с введением в структуру атомов цинка (ГАП+Zn) или нанотрубок галлуазита (ГАП+Г), а также одновременным введением атомов цинка и нанотрубок галлуазита (ГАП+Zn+Г). Исследование проводили на самцах мышей линии Balb/c (n=24). У 8 мышей из бедренной кости извлекали костный мозг (КМ), который наносили на каркасы и культивировали перед имплантацией *in vitro* в течение 45 минут. Остальным животным подкожно в подмышечную область имплантировали каркас с КФП и КМ. В соответствии с модификациями КФП было сформировано 4 группы по 4 особи в каждой. Через 45 суток животных выводили из эксперимента, изготавливали гистологические препараты тканевых пластинок (ТП), сформировавшихся на поверхности имплантатов. На препаратах оценивали биосовместимость имплантатов, их способность стимулировать образование костной ткани (КТ) и КМ, а также подсчитывали удельные площади (УП) КТ и КМ. Значения сравнивали при помощи критерия Краскела-Уоллиса. При гистологическом исследовании тканей, окружавших имплантаты, во всех группах не наблюдали признаков острой воспалительной реакции, что свидетельствует о биосовместимости тестируемых образцов. Все образцы ТП были покрыты соединительнотканной капсулой, под которой находились участки КТ с полостями, заполненными КМ, а также участки волокнистой соединительной и жировой тканей. Во всех исследуемых группах со одинаковой частотой (в 75% случаев) формировались КТ и КМ. При внедрении в структуру КФП атомов Zn или Г наблюдалось уменьшение площади КТ в сравнении с группой ГАП. Одновременное присутствие Zn и Г не изменяло площадь КТ относительно контрольной группы. В группе ГАП+Г наблюдалось снижение УП КМ в сравнении с группой ГАП. В группах ГАП+Zn и ГАП+Zn+Г значения УП КМ не отличались от контрольных, при этом максимальное значение УП КМ наблюдалось в группе ГАП+Zn+Г. Таким образом, модификация КФП атомами

цинка или галлуазитом несколько снижает его остеогенные свойства. Одновременная же модификация КФП атомами цинка и галлуазитом восстанавливает остеогенные свойства КФП и может придавать покрытию дополнительные потребительские свойства.

#### Литература

1. Tas AC, Bhaduri SB, Jalota S. Preparation of Zn-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) bioceramics. *Materials Science and Engineering*: C. 2007;27(3):394–401.

### OSTEOGENIC POTENTIAL OF COMPOSITE IMPLANTS WITH CALCIUM PHOSPHATE COATING MODIFIED WITH COPPER ATOMS AND/OR HALLOYSITE

A.V. Gorokhova<sup>1\*</sup>, E.D. Porokhova<sup>1</sup>,  
T.F. Nasibov<sup>1</sup>, A.N. Dzuman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Siberian State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
634050, Tomsk, Moskovsky Trakt 2

\* e-mail: a.gorokhova3062@gmail.com

**Keywords:** regenerative medicine, bone bioengineering, medical materials science.

### ОТ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR К CRISPR-ПРОТОБИОЛОГИИ И МОДЕЛЯМ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ (ФОРСАЙТ-АНАЛИЗ)

O.V. Gradov\*, M.A. Gradova

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Отдел динамики химических и биологических процессов  
119991, Москва, ул. Косыгина, 4

\* e-mail: o.v.gradov@gmail.com

**Ключевые слова:** CRISPR, CRISPR/Cas, эволюционная биология развития, синтетический морфогенез, протоклетки, протобиология, протофизиология, форсайт-анализ.

Широко известны работы по применению CRISPR в синтетической биологии растений и микроорганизмов. Таксономическое разнообразие этих объектов и их места на молекулярно-филогенетическом древе свидетельствуют о возможности как прямого, так и обратного эволюционного анализа или реконструкции некоторых аспектов их филогенеза с использованием CRISPR/Cas-технологий и соответствующих инструментов биоинформатики и системной биологии. Задачей "bottom up" анализа является «зондирование» вероятных форм по принципам эволюционной биологии развития, а для "top down" анализа принципиальной проблемой является реконструируемость наиболее ранних форм и молекулярно-биологических механизмов с использованием CRISPR/Cas-экспериментов. Предельной задачей является создание моделей CRISPR-содержащих протоклеток и их ансамблей, на основе транскрипционного сигналинга которых возможно моделирование коммуникации на клеточном уровне в синтетическом морфогенезе. Так,

в работе [1] использованы синтетические транскрипционные системы для получения диффузионного сигналинга РНК, регулирующего процессинг и локализацию ДНК на основе CRISPR/Cas в бинарном сообществе синтетических протоклеток. Авторами данной работы разработана синтетическая внеклеточная схема транскрипции на основе CRISPR/Cas внутри полупроницаемых белково-полимерных микрокомпартов, которые активируются ДНК-последовательностями и продуцируют функциональные аптамеры РНК с заданными свойствами. Далее «включается» транскрипционный модуль для генерации нитей РНК, функционирующих как диффузные сигналы, которые могут восприниматься соседними протоклетками, запуская в них активацию интернализированных ДНК-зондов или локализацию нуклеаз Cas. Таким образом, благодаря технологии CRISPR/Cas, смыкаются "bottom up" и "top down" подходы в синтетической биологии, порождая новые тренды исследований по "CRISPR-протобиологии / CRISPR-протофизиологии" и возможность воспроизведения на этой основе генетического сигналинга в моделях гистогенеза и морфогенеза многоклеточных структур. В настоящем докладе реализован полный библиографический анализ данных трендов.

#### Литература

1. Yang S, Joesaar A, Bögels BW et al. Protocellular CRISPR/Cas-based diffusive communication using transcriptional RNA signaling. *Angewandte Chemie International Edition*. 2022;61(26):e202202436.

### FROM CRISPR-BASED SYNTHETIC BIOLOGY TO CRISPR-PROTOBIOLOGY AND EVOLUTIONARY DEVELOPMENTAL BIOLOGY MODELS (FORESIGHT ANALYSIS)

O.V. Gradov\*, M.A. Gradova

N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Department of Dynamics of Chemical and Biological Processes

119991, Moscow, Kosygin Str. 4

\* e-mail: o.v.gradov@gmail.com

**Keywords:** CRISPR, CRISPR/Cas, evolutionary developmental biology, synthetic morphogenesis, protocells, protobiology, protophisiology, foresight analysis.

### ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ МСК ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛИОМЫ IN VITRO И IN VIVO

Д.А. Гурский<sup>1, 2\*</sup>, М.С. Мызина<sup>1, 2</sup>,  
Г.М. Юсубалиева<sup>1, 2, 3</sup>, В.П. Баклаушев<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральным научно-клиническим центром специализированных видов ФМБА России  
115682, Москва, Ореховый бульвар, 29

<sup>2</sup> ФЦМН ФМБА России  
117513, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 10

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук  
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

\* e-mail: gurskiy1412@gmail.com

**Ключевые слова:** глиобластома, мезенхимальные стромальные клетки, опухолевое микроокружение.

Глиобластома (ГБМ) — онкологическое заболевание центральной нервной системы. Быстрая диссеминация опухолевых клеток в паренхиму головного мозга усложняет резекцию опухоли. Прогноз для большинства пациентов неблагоприятный, средняя выживаемость 12–15 месяцев после максимальной хирургической резекции с последующей послеоперационной лучевой терапией и/или адъювантной химиотерапией [1].

Человеческие МСК были выделены из Вартонова студня (заключен Договор с роддомом). Для подтверждения принадлежности выделенных клеток к МСК использовались стандартные критерии: (1) клетки прикреплены к пластику при стандартных условиях культивирования; (2) экспрессия маркеров CD29, CD73, CD90, CD105; (3) отсутствие гемопоэтических маркеров CD45, CD34, CD11b и HLA II. Культуру глиобластомы получали из операционного материала пациентов ФЦМН и ФНКЦ ФМБА с разрешением ЛЭК. Полученные клетки глиомы трандуцировали лентивирусной конструкцией с флуоресцентным белком (mScarlet).

Для изучения взаимодействия МСК с ГБМ *in vitro* проводили ко-культивирование сфероидов ГБМ, сформированных в необработанном круглодонном 96-луночном планшете, а также ко-культивирование клеточной суспензии МСК и ГБМ. МСК метили прижизненным трейсером Cell Proliferation Dye eFluor™ 670. Наблюдение проводилось с помощью CellInsight CX7 LZR Pro HCS Platform и EVOS™ M7000 Imaging System.

Для оценки биораспределения МСК *in vivo* моделировали на иммунодефицитных мышах ортотопические ксенографты человеческой глиобластомы, меченную mScarlet. Контроль роста опухоли проводился с помощью MPT на томографе ClinScan 7T, Bruker Biospin (ЦКП «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии», РНИМУ. На 10 сутки вводили препарат МСК, через сутки проводили интравитальную микроскопию, через 48 часов извлекался головной мозг для проведения ИГХ на срезах методом конфокальной микроскопии (Nikon A1R MP+, Япония). МСК выявлялись путем колоколизации характерных маркеров, дополнительно маркируя на экспрессию специфичных маркеров.

#### Литература

1. Rodini CO, Gonçalves da Silva PB, Assoni AF et al. Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms. *Oncotarget*. 2018;9(37):24766–24777. doi: 10.18632/oncotarget.25346.

### TUMOR-ASSOCIATED MSC MODELS OF GLIOMA IN VITRO AND IN VIVO

D.A. Gurskiy<sup>1,2\*</sup>, M.S. Myzina<sup>1,2</sup>,  
Yusubalieva<sup>1,2,3</sup>, V.P. Baklaushev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FSCC FMBA of Russia  
115682, Moscow, Orechovy bulvar, 28

<sup>2</sup> FCBN FMBA of Russia  
117513, Moscow, Ostrovitianova st., 1-10

<sup>3</sup> V.A. Engelgardt's Institute of Molecular  
Biology RAS  
119991, Moscow, Vavilova st., 32

\* e-mail: gurskiy1412@gmail.com

**Keywords:** glioblastoma, mesenchymal stromal cells, tumor microenvironment.

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FLG* НЕ ЯВЛЯЕТСЯ КЛЮЧЕВЫМ МАРКЕРОМ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

M.A. Десятова<sup>1,2\*</sup>, A.B. Коротков<sup>1,2</sup>,  
С.Б. Антонова<sup>1</sup>, O.G. Makeev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Уральский государственный  
медицинский университет. Минздрава России  
620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3.

<sup>2</sup> ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных  
технологий  
620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а

\* e-mail: mardesyatova@yandex.ru

**Ключевые слова:** ген филлагрина (*FLG*), экспрессия, полимеразная цепная реакция (ПЦР), эпигенетика, атопический дерматит.

Атопическим дерматитом (АД) страдает до 20% детского населения во всем мире. Барьерную функцию кожи обеспечивают ороговевшие клетки верхнего слоя эпидермиса и водно-липидная мантия, покрывающая его поверхность. Повреждение этой структуры является основным дефектом кожи при АД. Это заболевание, как известно, имеет выраженный генетический компонент, а снижение уровня экспрессии гена *FLG* рассматривается в качестве ключевого маркера в патогенезе развития атопического дерматита.

В исследовании принимали участие шесть анамнестически здоровых доноров, а также тридцать два пациента разного пола и возраста (12–58 лет) с верифицированным заболеванием различной степени тяжести.

Показано, что изменения экспрессии гена *FLG* сопровождают развитие заболевания не более чем у 60% пациентов с установленным диагнозом АД (около 40% случаев тяжелой формы АД и до 20% случаев АД средней и легкой степени тяжести). Ранее нами было показано, что подобные нарушения (снижение уровня экспрессии гена *FLG*) встречаются у 13% здорового населения.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии дополнительных факторов, провоцирующих развитие АД. В качестве таковых может выступать нарушения экспрессии иных генов, что проявляется как синергетический либо суммационный эффект. Следует отметить, что *FLG* — это всего лишь один ген из более чем семидесяти генов, локализованных в эпидермальном дифференцировочном комплексе.

Возможно, что выявление взаимосвязи между состоянием гена *FLG* в сочетании с другими биомаркерами (генами, расположенными в области хромосомы 1q21, и эпигенетическими механизмами) прояснит патогенез этого многофакторного заболевания.

### *FLG* GENE EXPRESSION IS NOT A KEY MARKER OF ATOPIC DERMATITIS

M.A. Desyatova<sup>1,2\*</sup>, A.V. Korotkov<sup>1,2</sup>,  
S.B. Antonova<sup>1</sup>, O.G. Makeev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ural State Medical University. Ministry of Health  
of Russia  
620028, Ekaterinburg, Repin str. 3.

<sup>2</sup> Institute of Medical Cell Technology  
620026, Ekaterinburg, Karla Marksa str. 22a

\* e-mail: mardesyatova@yandex.ru

**Keywords:** filaggrin gene (*FLG*), expression, polymerase chain reaction (PCR), epigenetics, atopic dermatitis.

## СОЗДАНИЕ CRISPR/Cas9 СИСТЕМЫ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

О.А. Должикова<sup>1,2\*</sup>, М.И. Мещанинова<sup>1</sup>,  
Д.С. Новопашина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*e-mail: o.dolzhikova@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** регулируемая система CRISPR/Cas9, теофиллин, аптамер, аллостерическая регуляция, направляющие РНК.

Усовершенствование CRISPR/Cas9 системы в плане точности и эффективности работы является актуальной научной проблемой. Одним из подходов к ее решению является создание аллостерически регулируемых систем CRISPR/Cas9. Такие системы могут быть использованы как для регуляции системы при изменении концентрации определенных биомолекул в системе, так и для детекции этих биомолекул. Аллостерическая регуляция осуществляется путем связывания конкретных молекул с определенными сайтами фермента или аптамером, изменения конформации биомолекулы и активации или ингибирования ее активности.

Целью нашей работы было создание системы CRISPR/Cas9, действие которой можно аллостерически регулировать на уровне РНК. В качестве регуляторного фрагмента нами выбран аптамер к теофиллину.

На основе анализа литературных данных можно заключить, что наиболее удачными являются варианты дизайна направляющих РНК, в которых аптамер к теофиллину вводят в верхний стебель, связующую петлю или шпильку, находящиеся на 3'-конце sgРНК [1,2]. В качестве направляющих РНК нами были впервые сконструированы пары crРНК/tracrРНК, содержащих аптамер к теофиллину. Использование для адресации нуклеазы Cas9 пары относительно коротких РНК вместо единой протяженной молекулы sgРНК позволяет повысить скорость расщепления ДНК. Кроме того, такой вариант более удобен для твердофазного фосфитамидного синтеза и введения химических модификаций в ходе синтеза благодаря меньшему числу нуклеотидных звеньев в каждом из компонентов адресующей конструкции. Мы использовали вариант, при котором небольшой фрагмент (4–5 нуклеотидов) направляющей РНК заменяют на последовательность аптамера. В отсутствие теофиллина палиндромные последовательности, расположенные с 3'- и 5'-стороны от аптамера, образуют шпильку. Серии направляющих РНК (crРНК, tracrРНК и sgРНК), содержащих и не содержащих аптамер к теофиллину, были получены твердофазным фосфитамидным методом. Была исследована эффективность расщепления плазмидной ДНК нуклеазой Cas9 с использованием аптамерсодержащих направляющих РНК (sgРНК или пары crРНК/tracrРНК) в присутствии и в отсутствие теофиллина. Продемонстрированы отличия эффективности расщепления в зависимости от наличия и расположения аптамера в структуре направляющих РНК и наличия в системе аллостерического регулятора — теофиллина.

Аллостерически регулируемые системы CRISPR/Cas9 являются потенциальными инструментами для направленного управляемого расщепления ДНК. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 22-14-00294.

## Литература

1. Lin B. et al. Control of CRISPR-Cas9 with small molecule-activated allosteric aptamer regulating sgRNAs. *Chem Commun.* 2019;55(81):12223–12226.
2. Kundert K. et al. Controlling CRISPR-Cas9 with ligand-activated and ligand-deactivated sgRNAs. *Nat Commun.* 2019;10(1):2127.

## APPROACHES FOR THE ALLOSTERIC REGULATION OF CRISPR/Cas9 SYSTEM ON THE GUIDE RNA LEVEL

O.A. Dolzhikova<sup>1,2\*</sup>, M.I. Meschaninova<sup>1</sup>,  
D.S. Novopashina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 8

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, str. Pirogova, 2

\*e-mail: o.dolzhikova@g.nsu.ru

**Keywords:** regulated CRISPR/Cas9 system, theophylline, aptamer, allosteric regulation, guide RNA.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas13d ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РЕГУЛЯТОРА АПОПТОЗА XIAP В КЛЕТКАХ ГЛИБЛАСТОМЫ

А.С. Доме\*, П.Е. Карицкая,  
Н.С. Васильева, Г.А. Степанов

Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8

\*e-mail: domeanton@ya.ru

**Ключевые слова:** глиобластома, геномное редактирование, CRISPR/Cas13d (CasRx), онколитический вирус, апоптоз, нокдаун.

Глиобластома — одна из самых злокачественных опухолей, медианная выживаемость при глиобластоме с учетом достижений современной медицины составляет всего около 15 месяцев. Одним из перспективных методов лечения глиобластомы представляются онколитические вирусы. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact — двойной рекомбинантный онколитический вирус на основе вируса осповакцины [1]. В результате изучения молекулярных механизмов устойчивости клеток глиобластомы к VV-GMCSF-Lact было экспериментально показано, что уровень белка XIAP, кодируемого геном XIAP, достоверно повышается в линиях клеток, наиболее устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact. Для подавления экспрессии генов (как нокаута, так и нокдауна) используются различные методы, один из новейших — CRISPR/RfxCas13d (CasRx) [2]. Плюсом его использования является влияние на экспрессию на уровне РНК без вмешательства в геном клетки. Нами был модифицирован исходный вектор для экспрессии CasRx и направляющей РНК путем добавления гена mKate2, кодирующего красный флуоресцентный белок широкого спектра. Это позволяет проводить сортировку флуоресцирующих клеток вместо пуромициновой селекции, что особенно критично при нокдауне жизненно важных генов, а также использовать данную конструкцию для *in vivo* экспериментов с визуализацией. Были подобраны направляющие РНК на кодирующие участки mРНК XIAP с учетом вторичной

структуры данной мРНК. Доставка системы нокдауна в клетки модельной клеточной линии глиобластомы U87MG осуществлялась с помощью лентивирусных векторов. Дальнейшие эксперименты будут направлены на изучение влияния нокдауна гена XIAP на пролиферацию, миграцию, а также чувствительность клеток глиобластомы к вирусу VV-GMCSF-Lact.

#### Литература

1. Vasileva N, Ageenko A, Dmitrieva M et al. Double recombinant vaccinia virus: A candidate drug against human glioblastoma. *Life (Basel)*. 2021;11(10):1084.
2. Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*. 2018;173(3):665–676.

### USING THE CRISPR/Cas13d SYSTEM TO SUPPRESS THE REGULATOR OF APOPTOSIS XIAP IN GLIOBLASTOMA CELLS

A.S. Dome\*, P.E. Karitskaya,  
N.S. Vasileva, G.A. Stepanov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine, SB RAS  
630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Avenue*

\*e-mail: domeanton@ya.ru

**Keywords:** glioblastoma, genome editing, CRISPR/Cas13d (CasRx), oncolytic virus, apoptosis, knockdown.

### РОЛЬ СЕНЕСЦЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

М.И. Ездакова\*, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный

*ГНЦ РФ- ИМБП РАН  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А*

\*e-mail: ezdakova.mi@gmail.com

**Ключевые слова:** Мезенхимальные стромальные клетки, клеточное старение, ассоциированный со старением секреторный фенотип, эндотелиальные клетки, межклеточное взаимодействие.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) признаны важнейшими регуляторами процессов репарации и регенерации поврежденных тканей. В нише МСК тесно контактируют с соседними клетками различных типов, в том числе и с эндотелиальными клетками (ЭК). С возрастом происходит постепенное истощение пула МСК и изменение их функционального состояния, в том числе и паракриного профиля, что, в свою очередь, может повлиять на тесно соседствующие с ними ЭК.

В работе использовали линейные МСК (ASC52telo — ATCC® SCRC-4000™) и ЭК (EA.hy926 — ATCC® CRL-2922™). Для достижения сенесцентного состояния МСК (МСК/МмС+) предварительно обрабатывали митомицином С (18 ч, 1.5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в течении 10 дней, статус «состаренных» клеток был подтвержден методически. Для выявления эффектов секрета МСК: в культуральную среду ЭК добавляли кондиционированную среду (КС) от МСК/МмС± в соотношении 1:1. Время экспозиции — 48 часов. Анализ экспрессии молекул межклеточного взаимодействия VCAM-1, Е-селектин, ICAM-1, интегрин α1, а также

АФК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. Содержание паракринных медиаторов в образцах КС определяли с помощью MILLIPLIX MAP (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel — Premixed 48 Plex — Immunology Multiplex Assay) (Merck, Germany). Анализ экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в реальном времени.

Известно, что активация сенесцентного состояния приводит к увеличению размера клеток и гранулярности цитоплазмы. А необратимый арест клеточного цикла является главным признаком клеточного старения. Мы не обнаружили изменений в морфологии клеток. Однако отмечались изменения в клеточном приросте, ЭК культивируемые в КС от МСК/МмС+, достоверно менее активно пролиферировали (1,5 раза) (p<0,05), а уровень их окислительного стресса достоверно увеличивался (1,6 раза) (p<0,05). У ЭК культивируемых в КС от МСК/МмС+, увеличивалась экспрессия молекул ICAM-1. Экспрессия интегрина α1, VCAM-1, Е-селектина не изменялась. Добавление КС от МСК/МмС+ к ЭК приводило к достоверному повышению концентрации: GM-CSF (7,7 раза), G-CSF (39 раз), GROα (2,7 раза), IL-6 (4,3 раза), IL-8 (1,2 раза), MCP-1 (1,3 раза), MCP-3 (7,6 раза), PDGF-AA (1,4 раза), RANTES (1,8 раза) (p<0,05). Транскрипционный анализ показал, что КС от МСК/МмС+ снижала экспрессию в ЭК мРНК ITGA1 (3 раза), MCP1 (1,7 раза) и повышала мРНК IL8 (17 раз) и IL6 (1,5 раз) (p<0,05). Уровень транскрипции ICAM1 и VCAM1 не изменялся.

Полученные данные указывают на то, что сенесцентные МСК, являясь одним из элементов тканевой ниши, вносят свой вклад в модификацию свойств ЭК, что может повлечь за собой ряд последствий, в том числе повышение риска канцерогенеза, модуляции процессов ангиогенеза и др. Финансовая поддержка: грант РФФ № 21-75-10117.

### ROLE OF SENESCENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN THE REGULATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF ENDOTHELIAL CELLS

М.И. Ездакова\*, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный

*Institute for Biomedical Problems of the Russian  
Academy of Sciences (IBMP RAS)  
123007, Moscow, Kharoshevskoye shosse, 76A*

\*e-mail: ezdakova.mi@gmail.com

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, cell senescence, senescence-associated secretory phenotype, endothelial cells, cell-cell interaction.

### ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ БЕЛКА CDNF В ГИППОКАМПе НА СЕРТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА И ПОВЕДЕНИЕ У МЫШЕЙ

Д.В. Еремин<sup>1\*</sup>, Н.В. Хоцкин<sup>1</sup>,  
В.С. Науменко<sup>1</sup>, А.С. Цыбоко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

\*e-mail: dima.969696@mail.ru

**Ключевые слова:** CDNF, серотониновая система, поведение.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) способен защищать нейроны в различных моделях нейродегенеративных заболеваний. Более того, CDNF участвует в созревании многих типов нейронов, а его отсутствие может оказать негативное влияние на поведение [1]. Известно, что серотониновая (5-HT) система мозга отвечает за разнообразные поведенческие паттерны. Вполне возможно допустить, что CDNF и 5-HT система могут взаимодействовать, но каким образом, до конца не ясно. Поэтому целью данной работы стало изучение влияния сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе на серотониновую систему мозга и поведение у мышей.

Эксперимент проводился на самцах мышей линии C57Bl/6J. Сверхэкспрессию белка CDNF вызывали с помощью введения в гиппокамп аденоассоциированного вирусного конструкта, несущего ген *Cdnf*. Через 4 недели после инъекции были проведены следующие тесты: распознавание нового объекта, трехкамерный социальный тест, тест резидент-интродер, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, подвешивание за хвост, оперантная стенка, водный лабиринт Морриса. После этого измеряли уровни генов серотониновых рецепторов и генов, отвечающих за метаболизм 5-HT.

Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе у мышей не оказала влияния на неophobia, двигательную активность, тревожное и депрессивноподобное поведение, ассоциативное и пространственное обучение. Кроме того, не было выявлено эффектов на потребление пищи и воды, а также на сон. Однако в тесте резидент-интродер было статистически выше количество и время социальных контактов, а в трехкамерном тесте был выше индекс социального предпочтения у животных со сверхэкспрессией CDNF. Также у этих животных было выявлено снижение уровня мРНК гена *Htr1a* и повышение уровня мРНК гена *Maoa* в гиппокампе, но это не совпало с уровнем белка соответствующих генов. При этом уровни 5-HT<sub>2A</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторов не отличались. В среднем мозге не было обнаружено эффекта на уровни ТПГ-2 и 5-HTT, ответственных за метаболизм 5-HT.

Нами впервые показано, что сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе у мышей оказала просоциальный эффект, при этом не затрагивая другие паттерны поведения. Также изменились уровни мРНК генов, кодирующих 5-HT<sub>1A</sub> рецептор и MAO-A, в гиппокампе. Таким образом, сверхэкспрессия CDNF оказала эффект на поведение, но, по-видимому, это мало связано с серотониновой системой. Работа выполнена при поддержке молодежного проекта FWNR-2022-0010.

#### Литература

Chen YC, Baronio D, Semenova S, Abdurakhmanova S, Panula P. Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior. *J Neurosci*. 2020;40(32):6146–6164. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.

#### EFFECTS OF CDNF PROTEIN OVEREXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS ON THE BRAIN SEROTONIN SYSTEM AND BEHAVIOR IN MICE

D.V. Eremin<sup>1</sup>, N.V. Khotskin<sup>1</sup>, V.S. Naumenko<sup>1</sup>, A.S. Tsybko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630090, Novosibirsk, 10, Ac. Lavrentieva ave.

\*e-mail: dima.969696@mail.ru

**Keywords:** CDNF, serotonin system, behavior.

#### ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ОБЩЕМ ТЕРМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Д.Н. Задорина<sup>1,2\*</sup>, О.С. Арташян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д.106

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

620002, Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

\*e-mail: zadorina.d@gmail.com

**Ключевые слова:** тучные клетки, щитовидная железа, стресс, термическое воздействие, температура.

Щитовидная железа (ЩЖ) реагирует на изменения внутренней и внешней среды, меняя уровень функциональной активности органов и систем, в свою очередь находясь в структурно-функциональном взаимодействии со своим локальным микроокружением, которое может оказывать влияние на ее состояние. Строма ЩЖ богата тучными клетками (ТК), продуцирующими широкий спектр медиаторов. ТК могут играть определенную роль в ремоделировании ткани железы при стрессе [1]. Существуют данные, свидетельствующие о подавлении функции ЩЖ при нагревании [2]. При этом информации о влиянии высокой температуры на реакцию микроокружения ЩЖ, и, в частности ТК, недостаточно. Цель — изучить влияние общего термического воздействия на структурно-функциональное состояние ЩЖ и реакцию ТК в ней.

Исследование проводилось на самцах крыс линии Вистар, в возрасте 4 месяца, n=5 для каждой группы. Экспериментальной группе моделировали хронический температурный стресс (ХТС): в течение 48 дней ежедневно помещали в термостат при температуре 43–44 °С на 30 минут. С контрольной группой проводили те же манипуляции при комнатной температуре ~23 °С ± 2 °С. Гистологический материал окрашивали толуидиновым синим (оценка ТК) и гематоксилином-эозином.

Результаты исследования показали, что под влиянием ХТС в ЩЖ общий диаметр фолликулов увеличивается, что свидетельствует о накоплении большего количества секрета (коллоида) внутри них; высота тиреоидного эпителия при этом уменьшается, что косвенно говорит о снижении синтетической функции тироцитов. Наблюдается снижение числа кровеносных сосудов. Т.о., происходит накопление секрета внутри железы, замедляется выброс гормонов в кровоток. В популяции ТК также отмечаются изменения: уменьшается количество активно дегранулирующих клеток и увеличивается количество недегранулирующих, — что говорит о снижении их активности выброса гранул, содержащих гепарин, гистамин, химазу, триптазу, VEGF и ряд других цитокинов, которые оказывают влияние на ангиогенез и проницаемость сосудов.

В результате действия ХТС происходит снижение функциональной активности компонентов ЩЖ, сопровождающееся уменьшением дегрануляционной активности ТК стромы ЩЖ, которые, в свою очередь, через ослабление влияния на микроциркуляторное русло могут оказывать значимое воздействие на состояние органа.

#### Литература

1. Valent P., Baghestanian M, Bankl HC et al. New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells. *Thromb Haemost*. 2002;87(5):786–790. doi: 10.1055/s-0037-1613084.

2. Visinin VI, Kavtarashvili ASH. Heat stress in poultry. Report I. Danger, physiological changes in the body, signs and manifestations (overview). *Selskokhozyaystvennaya biologiya*. 2015;50(2):162–171. (In Russ). doi: 10.15389/agrobiologia.2015.2.162rus.

## GENERAL THERMAL EXPOSURE ON THYROID MAST CELLS

D.N. Zadorina<sup>1,2\*</sup>, O.S. Artashyan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*  
620049, Yekaterinburg, Pervomayskaya str., 106

<sup>2</sup> *Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin*  
620002, Yekaterinburg, Mira str., 19

\*e-mail: zadorina.d@gmail.com

**Keywords:** mast cells, thyroid gland, stress, thermal exposure, temperature.

## НАПРАВЛЕННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК-МИШЕНЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫМ БЕЛКОМ-АРГОНАВТОМ С ПОМОЩЬЮ РНК-ГИДОВ

Ю.С. Зайцева<sup>1,2</sup>, А.А. Агапов<sup>1</sup>, Д.М. Есюнина<sup>1,3</sup>,  
А.В. Кульбачинский<sup>1,3</sup>, Л.А. Лисицкая<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

<sup>2</sup> *МГУ имени М.В. Ломоносова*  
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

<sup>3</sup> *Институт биологии гена РАН*  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

\*e-mail: lisidiya@gmail.com

**Ключевые слова:** белок-Аргонавт, DekAgo, *Deinococcus*, программируемая нуклеаза, гидовая РНК, ДНК-мишень.

Белки семейства Аргонавтов играют центральную роль в процессах РНК-интерференции у эукариот в комплексе с малыми некодирующими РНК. У некоторых прокариот также обнаружены белки-Аргонавты (rAgo) [1]. Предполагают, что белки rAgo являются основными компонентами иммунных систем, которые используют короткие ДНК или РНК для узнавания и уничтожения вирусной и плазмидной ДНК или РНК [1–4]. Такие черты Аргонавтов, как связывание гидовых нуклеиновых кислот и эндонуклеазная активность, напоминают активность связывающих РНК-гиды белков иммунной системы CRISPR-Cas. Примечательно, что прокариоты с активными белками rAgo чаще содержат гены систем CRISPR-Cas в своих геномах, чем штаммы с неактивными белками rAgo или без них [4]. Данная работа посвящена исследованию нуклеазной активности белка-Аргонавта DekAgo из мезофильной бактерии *Deinococcus sp.* Определено, что белок принадлежит к группе Аргонавтов, расщепляющих ДНК-мишени в комплексе с РНК-гидом. Проведены эксперименты *in vitro* с очищенным белком и одноцепочечными олигонуклеотидами. Показано, что белок DekAgo обладает нуклеазной активностью в диапазоне температур от 30 до 45 °С в присутствии ионов магния или марганца. DekAgo имеет предпочтение к наличию фосфата на 5'-конце гидов, но при этом может использовать гидовые молекулы различной длины (от 14 до 30 нуклеотидов). Мишень расщепляется в нескольких позициях в присутствии одного гида, что указывает на возможность перемещения дуплекса гида и мишени внутри эффекторного

комплекса. Данная особенность характерна и для других белков данной группы. Для изучения связывания ДНК-мишени без её расщепления получен мутантный вариант DekAgo с заменами в активном центре. Исследованные свойства DekAgo делает его перспективным инструментом для генной инженерии и геномных манипуляций в клетках бактерий и эукариот. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00182.

## Литература

1. Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, Koonin EV. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct*. 2009;4:29.
2. Olovnikov I, Chan K, Sachidanandam R et al. Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell*. 2013;51:594–605.
3. Swarts DC, Jore MM, Westra ER et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. 2014;507:258–261.
4. Kuzmenko A, Oguienko A, Esyunina D et al. DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature*. 2020;587:632–637.
5. Ryazansky S, Kulbachinskiy A, Aravin AA. The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins. *MBio*. 2018;9:1–20.

## BACTERIAL ARGONAUTE PROTEIN USES RNA GUIDES FOR TARGET DNA CLEAVAGE

Y.S. Zaitseva<sup>1,2</sup>, A.A. Agapov<sup>1</sup>, D.M. Esyunina<sup>1,3</sup>,  
A.V. Kulbachinskiy<sup>1,3</sup>, L.A. Lisitskaya<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> *National Research Center “Kurchatov Institute”*  
123182, Moscow, Akademika Kurchatova square, 2

<sup>2</sup> *Lomonosov Moscow State University*  
119234, Moscow, Leninskiye Gory, 1, building 12

<sup>3</sup> *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences*  
119334, Moscow, Vavilov street, 34/5

\*e-mail: lisidiya@gmail.com

**Keywords:** Argonaute protein, DekAgo, *Deinococcus*, programmable nuclease, guide RNA, target DNA.

## СОЗДАНИЕ КЛЕТочНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ c.6055G>A В ГЕНЕ LRRK2 НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЛУТАМИОНА

Е.В. Капитошина<sup>1,2\*</sup>, С.П. Медведев<sup>1</sup>,  
С.М. Закиян<sup>1</sup>, А.А. Малахова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»*  
630090, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»*  
630090, Новосибирск, Россия

\*e-mail: kapitoshina@list.ru

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, болезнь Паркинсона, генетически кодируемые биосенсоры.

Болезнь Паркинсона — распространённое нейродегенеративное заболевание [1]. В его основе лежат разные процессы: нейровоспаление, дисфункция митохондрий, окислительный стресс в нейронах и др. [2]. Причины нарушений могут быть как идиопатические, так и генетические. Одна из частых генетических причин — это мутации в гене *LRRK2* [3]. Клеточные модели позволяют исследовать связь мутации с цитопатологическими изменениями, а визуализация этих процессов может обеспечиваться генетически кодируемыми биосенсорами, имеющими в своем составе флуоресцентный белок. Использование такой модели позволит понять специфические пути развития патологии и возможные механизмы возникновения болезни Паркинсона.

Цель исследования — создание клеточной модели болезни Паркинсона, несущей трансген биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона GRX1-roGFP2.

В работе использовалась линия LR-21 индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с болезнью Паркинсона, несущего патогенную мутацию с.6055G>A в гене *LRRK2* [4]. В локус *AAVS1* данной линии встраивали последовательности биосенсоров с цитоплазматической (Cyto-GRX1-roGFP2) и митохондриальной (Mito-GRX1-roGFP2) локализацией. Клетки трансфицировали плазмидами, несущими конструкции биосенсора и тетрациклинового трансактиватора, совместно с плазмидой, кодирующей компоненты системы CRISPR/Cas9. После селекции на антибиотиках: пурамицине и неомицине — механически отбирали устойчивые колонии и культивировали их в присутствии доксициклина, активирующего экспрессию трансгена. Методом ПЦР проверяли наличие нецелевых встроек трансгена и локуса *AAVS1* дикого типа (без встройки). Получено по 31 клону со встройками Cyto-GRX1-roGFP2 и Mito-GRX1-roGFP2, все они были GFP-позитивные. Отсутствие нецелевых встроек и локуса дикого типа было установлено у 19 клонов с Cyto-GRX1-roGFP2 и 17 клонов с Mito-GRX1-roGFP2. По 3 клона с каждой встройкой биосенсора были охарактеризованы для подтверждения статуса плюрипотентности и запущены в нейрональную дифференцировку для получения дофаминергических нейронов. С помощью созданной клеточной модели можно изучать влияние мутации *LRRK2* (с.6055G>A) на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона. Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

#### Литература

1. Poewe W et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17013.
2. Aarsland D et al. Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:47.
3. Paisán-Ruiz C et al. *LRRK2*: Cause, risk, and mechanism. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(2):85–103.
4. Григорьева Е.В. и др. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGiO43-A с помощью репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента с болезнью Паркинсона, ассоциированной с патологическим вариантом р.G2019S *LRRK2*. *Онтогенез*. 2023;54(1):79–86.

#### CREATION OF A CELL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE TO STUDY THE EFFECT OF THE c.6055G>A MUTATION IN THE *LRRK2* GENE ON THE REDOX POTENTIAL OF GLUTATHIONE

E.V. Kapitoshina<sup>1,2</sup>, S.P. Medvedev<sup>1</sup>, S.M. Zakian<sup>1</sup>, A.A. Malakhova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences  
630090, Novosibirsk, Russia

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

\* e-mail: kapitoshina@list.ru

**Keywords:** induced pluripotent stem cells, Parkinson's disease, genetically encoded biosensors.

#### РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *ZNF831* В РАЗВИТИИ АНЕМИИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Н.С. Карпова<sup>1\*</sup>, О.П. Дмитренко<sup>1</sup>, М.К. Нурбеков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» ФГБНУ «НИИОПП»  
125315, Москва, ул. Балтийская, дом 8

\* e-mail: nataliakarpova.sp@gmail.com

**Ключевые слова:** *ZNF831*, анемия, сердечно-сосудистые заболевания, преэклампсия, rs259983.

Цинк-связывающий белок *ZNF831*, регулирующий экспрессию множества генов, является неизученным белком.

В GWAS-catalog мы обнаружили 101 ассоциацию полиморфизмов гена *ZNF831* с сердечно-сосудистыми заболеваниями (гипертония, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда), а также с гестационной гипертонией и преэклампсией [1]. Полиморфизмы данного гена связаны с размером тромбоцитов, количеством лимфоцитов, соотношением лимфоциты/лейкоциты, нейтрофилы/лейкоциты, тромбоциты/лимфоциты.

Для дальнейшего анализа мы выбрали rs259983 гена *ZNF831*, который ассоциирован с преэклампсией [2]. С помощью OligoArchitect Online мы разработали Taq-Man ПЦР систему. Несмотря на то что мы не обнаружили ассоциацию rs259983 с преэклампсией, была выявлена взаимосвязь генотипа CC в рецессивной модели наследования с анемией, развившейся во время беременности ( $p=0,036$ ) (неопубликованные данные). Известно, что при железодефицитной анемии наблюдаются изменения не только в эритроцитах, но и в тромбоцитах [3]. Например, с шириной распределения тромбоцитов ассоциированы rs558916355, rs536403690, rs574551002, rs1011559036, rs259958, rs260019, rs77124424 и rs2043671 гена *ZNF831*.

В последние годы показано, что многие ранее аннотированные как цинк-связывающие белки, могут связывать и другие ионы металлов [4]. Исходя из этого, мы предположили, что *ZNF831* может связывать ионы металлов, вовлеченные в патогенез анемии. Анализ в программе MeBiPred подтвердил, что белок *ZNF831* может связывать ионы Ca, Fe, K, Mg, Na, Ni, Zn [5].



Наше пилотное исследование демонстрирует, что полиморфизм rs259983 гена *ZNF831* может быть связан с развитием анемии во время беременности. Наши данные указывают на необходимость дальнейшего исследования связи между полиморфизмом rs259983 гена *ZNF831* и анемии с одновременным изучением других генетических вариаций *ZNF831*, которые также могут способствовать возникновению этого заболевания.

#### Литература

1. Sollis E et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog: knowledge-base and deposition resource. *Nucleic Acids Research*. 2022;51(1):977–985. doi: 10.1093/nar/gkac1010.
2. Steinhorsdottir V, McGinnis R, Williams NO et al. Genetic predisposition to hypertension is associated with preeclampsia in European and Central Asian women. *Nat Commun*. 2020;11(1):5976. doi: 10.1038/s41467-020-19733-6.
3. Kadikoylu G, Yavasoglu I, Bolaman Z, Senturk T. Platelet parameters in women with iron deficiency anemia. *J Natl Med Assoc*. 2006;98(3):398–402.
4. Pritts JD, Michel SLJ. Fe-S clusters masquerading as zinc finger proteins. *J Inorg Biochem*. 2022;230:111756. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111756.
5. Aptekmann AA et al. mebiPred: identifying metal-binding potential in protein sequence. *Bioinformatics*. 2022;38(14):3532–3540.

### THE ROLE OF *ZNF831* GENE POLYMORPHISMS IN THE DEVELOPMENT OF ANEMIA DURING PREGNANCY

N.S. Karpova<sup>1\*</sup>, O.P. Dmitrenko<sup>1</sup>, M.K. Nurbekov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology  
125315, Moscow, st. Baltiyskaya, 8

\*e-mail: nataliakarpova.sp@gmail.com

**Keywords:** *ZNF831*, anemia, cardiovascular disease, preeclampsia, rs259983.

### ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН МЕЛКОДИСПЕРСНЫМ ПОТОКОМ ВОДЫ, ОБОГАЩЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ВОДОРОДОМ

П.А. Коновалов\*, А.А. Глухов, А.А. Андреев,  
Н.О. Михайлов, С.С. Захарова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

\*e-mail: dr.kon68@gmail.com

**Ключевые слова:** молекулярный водород, раневой процесс.

Проблема ран мягких тканей остается одной из наиболее актуальных по причине большого количества обращений населения с данной патологией за хирургической помощью. Часть раневых дефектов подвергается инфицированию с последующим нагноением.

Цель исследования — ускорение заживления ран, репаративных процессов в мягких тканях, за счет

применения мелкодисперсного потока воды, обогащенной молекулярным водородом.

Обработка ран мелкодисперсным потоком (давление в рабочем блоке — до 7 атм.) производилась с использованием прибора УГО-1, разработанным совместно с КБ «Химавтоматика», Воронеж.

Изучение воздействия воды, обогащенной молекулярным водородом, на течение репаративных процессов в асептических и септических ранах проводилось в двух блоках.

В контрольной группе лечение осуществляли с помощью мелкодисперсной обработки раневого дефекта изотоническим 0,9% раствором натрия хлорида, в опытных группах — с использованием воды, обогащенной молекулярным водородом. Оценка репаративных процессов проводилась при помощи общеклинических, лабораторных, морфологических и статистических методов.

Мелкодисперсная обработка водой, обогащенной молекулярным водородом, показала наилучшие результаты в лечении септических ран, а именно: в ускорении сроков заживления в 1,5–1,7 раза по сравнению с контрольной группой. При проведении морфологических исследований отмечено, что использование воды, обогащенной молекулярным водородом, в лечении септических ран ускоряет формирование коллагеновых волокон, фибрина, эпидермиса, восстановление мышечных волокон. В совокупности применение водородной воды в лечении септических ран мягких тканей позволило значительно сократить площадь раны.

Проведенные исследования показали безопасность и высокую эффективность применения мелкодисперсной обработки водой, обогащенной молекулярным водородом в лечении раневых дефектов, что делает перспективным применение данной технологии в клинических условиях.

#### Литература

1. Андреев АА, Глухов АА, Остроушко АП и др. Моделирование асептических и септических ран мягких тканей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022;173(3):272–278.
2. Табалдыев АТ. Современные методы лечения гнойных ран и их эффективность. Бюллетень науки и практики. 2022;8(12):311–319.
3. Орлова ОВ. Новые биотехнологии в лечении ран мягких тканей. *Scientist (Russia)*. 2023;1(23):36–38.
4. Аникин АИ, Завьялов БГ, Ларичев СЕ и др. Комплексное хирургическое лечение пациентов с некротическими инфекциями мягких тканей. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2023;6:34–41.

### TREATMENT OF EXPERIMENTAL WOUNDS WITH A FINELY DISPERSED FLOW OF WATER ENRICHED WITH MOLECULAR HYDROGEN

P.A. Konovalov\*, A.A. Gluhov, A.A. Andreev,  
N.O. Mihajlov, S.S. Zaharova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «N.N. Burdenko Voronezh State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
394036, Voronezh, Studencheskaya street, 10

\*e-mail: dr.kon68@gmail.com

**Keywords:** molecular hydrogen, wound process.

## ЛОКУС CG06256735, РАСПОЛОЖЕННЫЙ В РЕГУЛЯТОРНОМ РАЙОНЕ ГЕНА MFAP5, ГИПОМЕТИЛИРОВАН В ИНТИМАЛЬНОМ СЛОЕ СТЕНКИ ВЕНЫ ПРИ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

В.А. Короленя<sup>1,2</sup>, К.С. Севостьянова<sup>2,3</sup>,  
К.А. Гаврилов<sup>2,3</sup>, А.И. Шевела<sup>2,3</sup>,  
М.Л. Филипенко<sup>1</sup>, М.А. Сметанина<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины (ИХБФМ) СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

<sup>3</sup> Центр новых медицинских технологий ИХБФМ  
СО РАН

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 25/4

\*e-mail: mariya\_smetanina@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** варикозная болезнь нижних конечностей, слои венозной стенки, ген MFAP5, метилирование ДНК.

Молекулярный патогенез варикозной болезни нижних конечностей (ВБНК) все еще остается малоизученным, и особый интерес представляет исследование процессов в каждом из слоев венозной стенки, отличающихся клеточным составом. Ранее было показано, что локус cg06256735 в регуляторном районе гена MFAP5 (-409 от сайта начала транскрипции) гипометилирован при ВБНК, что согласовывалось с повышенной экспрессией этого гена [1,2]. Настоящее исследование посвящено определению статуса метилирования этого локуса в разных слоях стенки вены при ВБНК. Ген MFAP5 кодирует компонент внеклеточного матрикса (ассоциированный с микрофибриллами белок MFAP-5), связанный с такими процессами, как «организация внеклеточного матрикса», «адгезия клеток» и «морфогенез кровеносных сосудов». Он играет важную роль в сохранении целостности сосудов.

В данной работе был использован послеоперационный материал парных образцов вен из бассейна большой подкожной вены: варикозный (ВВ) и неварикозный (НВ) сегменты от каждого исследуемого пациента с ВБНК. Поперечные срезы вен были разделены на слои (*t. intima*, *t. media*, *t. adventitia*) иглами под увеличением. ДНК была выделена из 42 образцов слоев стенок вен от 7 пациентов с клиническим статусом С2-С3 (классификация CEAP). Уровень метилирования локуса cg06256735 определяли с использованием метилчувствительной нуклеазы рестрикции ESP3I (подобрана с помощью программы Vector NTI 10.0.1) с последующим проведением ПЦР в реальном времени. Статистический анализ выполнен с помощью пакетов программ Excel и STATISTICA.

В результате анализа было обнаружено, что локус cg06256735 гипометилирован в интимае варикозных вен по сравнению с неварикозными: процент метилированных цитозинов в НВ в 1,31 раз больше, чем в ВВ (*p*-value: 0,03 (парный *t*-критерий Стьюдента), ДИ: 1,09–1,52). В остальных слоях не было показано значимой разницы в метилировании локуса cg06256735 между ВВ и НВ.

Гипометилирование локуса cg06256735 в интимальном слое стенки ВВ вносит основной вклад в изменение статуса его метилирования при ВБНК и может объяснять активацию экспрессии гена MFAP5 в ВВ. Исследование поддержано грантом Российского научно-го фонда № 22-25-00832.

## Литература

1. Smetanina MA, Kel AE, Sevost'ianova KS et al. DNA methylation and gene expression profiling reveal MFAP5 as a regulatory driver of extracellular matrix remodeling in varicose vein disease. *Epigenomics*. 2018;10(8):1103–1119. doi: 10.2217/epi-2018-0001.
2. Smetanina MA, Sipin FA, Sevost'ianova KS et al. Two CpG loci in the regulatory regions of the MFAP5 gene are hypomethylated in varicose veins. In: Simka M, editors. *Phlebological review*. International Union of Phlebology: Chapter Meeting. Krakow: Termedia Publish House; 2019. P:23–24.

## LOCUS CG06256735 LOCATED IN THE REGULATORY REGION OF THE MFAP5 GENE IS HYPOMETHYLATED IN THE INTIMA LAYER OF THE VEIN WALL IN VARICOSE VEIN DISEASE

V.A. Korolenya<sup>1,2</sup>, K.S. Sevostyanova<sup>2,3</sup>, K.A. Gavrilov<sup>2,3</sup>,  
A.I. Shevela<sup>2,3</sup>, M.L. Filipenko<sup>1</sup>, M.A. Smetanina<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine (ICBFM) SB RAS

630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Ave.

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, 1 Pirogova Str.

<sup>3</sup> Center for New Medical Technologies ICBFM SB RAS

\*e-mail: mariya\_smetanina@niboch.nsc.ru

**Keywords:** varicose vein disease, venous wall layers, MFAP5 gene, DNA methylation.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПРИЗНАКА ПЛЕНЧАТОСТИ/ГОЛОЗЕРНОСТИ ЯЧМЕНЯ НА МОДЕЛИ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

А.М. Короткова<sup>1\*</sup>, А.И. Скрипилева,  
А.В. Вихорев, Е.В. Колосовская<sup>1</sup>,  
С.В. Герасимова<sup>1</sup>, Е.К. Хлесткина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ИЦиГ СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Всероссийский институт растениеводства имени  
Н.И. Вавилова

190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42

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

**Ключевые слова:** CRISPR, транскриптом, *Nud*, голозерный ячмень.

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) — важная продовольственная культура во всем мире и, в частности, в России. Признак голозерности является ценным селекционным признаком. Голозерный ячмень имеет преимущества перед пленчатым для потребления: он является более дешевым в переработке и содержит больше ценных пищевых компонентов. Ген *Nud* кодирует фактор транскрипции, предположительно участвующий в формировании липидного слоя на поверхности зерна. В случае, когда функция гена *Nud* утрачена, цветковые чешуи больше не прикрепляются к поверхности зерна, что приводит к голозерному фенотипу. В исследовании мы получили линии с модифицированным геном *nud* путем сайт-направленного мутагенеза с использованием направляющей РНК и эндонуклеазы Cas9 в сорте ярового ячменя Golden promise [1].

Для транскриптомного анализа выбрана одна из полученных мутантных линий с геном *nud*, показавшая

наилучшие результаты при анализе агрономически значимых свойств [2]. Цель эксперимента — выявить набор генов, участвующих в формировании свойства голозерности. Для эксперимента взяты две изогенные линии (отличающиеся только геном *Nud*): контрольная линия и мутантная линия *nud*. Семенные оболочки зерен для эксперимента собирали на двух стадиях развития колоса: 1) ранняя молочная спелость — чешуи свободно отходят от зерна, 2) восковая спелость — чешуи начинают прилипать к зерну.

РНК выделяли из внутренних оболочек зерна и проводили транскриптомный анализ на платформе Illumina NextSeq 550. В результате исследования идентифицирована группа генов с повышением (51) и группа генов с понижением экспрессии (185) в мутантной линии относительно контрольной. Для дальнейшей проверки отобраны 19 генов. Для каждого гена изменение уровня экспрессии было подтверждено количественным ПЦР-анализом. Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-66-00012.

#### Литература

1. Gerasimova SV, Hertig C, Korotkova AM et al. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the *NUD* gene. *BMC Plant Biol.* 2020;20:255.
2. Antonova EV, Shimalina NS, Korotkova AM et al. Seedling biometry of *nud* knockout and *win1* knockout barley lines under ionizing radiation. *Plants.* 2022;11:2474.

### STUDY OF THE MECHANISMS OF THE FORMATION OF BARLEY HULLED/NAKED TRAITS ON THE MODEL OF ISOGENIC LINES OBTAINED BY GENOME EDITING

А.М. Korotkova<sup>1\*</sup>, А.И. Skripileva,  
А. Vihorev, Е.В. Kolosovskaya<sup>1</sup>,  
S.V. Gerasimova<sup>1</sup>, Е.К. Khlestkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentieva, 10

<sup>2</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic  
Resources  
190000, St. Petersburg, Morskaya, 42

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

**Keywords:** CRISPR, transcriptome, *Nud*, naked barley.

### ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛЕНТИКУЛЯРНОГО БИОМАТЕРИАЛА ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА RELEX SMILE, НА ПРОЦЕССЫ ТКАНЕВОЙ РЕПАРАЦИИ В МОДЕЛИ ПОМУТНЕНИЯ РОГОВИЦЫ

К.Ю. Краснер<sup>1,2\*</sup>, М.А. Суровцева<sup>1</sup>,  
Н.А. Бондаренко<sup>1</sup>, И.И. Ким<sup>1</sup>, Е.В. Чепелева<sup>1</sup>,  
А.Н. Трунов<sup>2</sup>, В.В. Черных<sup>2</sup>, О.В. Повещенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИКЭП — филиал ФИЦ Институт цитологии  
и генетики СО РАН  
630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им.  
акад. С.Н. Федорова Минздрава России  
630096, Новосибирск, ул. Колхидская, 10

\*e-mail: kityli@mail.ru

**Ключевые слова:** клетки стромы роговицы, кератоциты, фибробласты, Relex Smile, регенерация роговицы.

Клеточная терапия с использованием стромальных клеток роговицы человека может стать альтернативным подходом лечения патологий стромы, связанных с восстановлением прозрачности, восполнением утраченной толщины роговицы [1].

Цель исследования — определение эффекта введения клеточных популяций стромы роговицы на толщину и прозрачность роговицы в модели стромального помутнения.

Стромальную травму роговицы *in vivo* на мышах ( $n=30$ ) формировали механически с помощью иглы 33G [2]. Интрастромально вводили  $2,5 \cdot 10^4$  кератоцитов (К), фибробластов (Ф) или физиологический раствор в объеме 2 мкл на мышью однократно. Группа контроля включала животных с травмой. Через 31 день оценивали функциональные свойства роговицы биомикроскопией переднего отрезка глаза на целевой лампе Carl Zeiss Meditech (Германия) с флюоресцеиновой пробой, компьютерной оптической томографией переднего отрезка глаза на томографе Optovue XR Avanti (США). Индекс прозрачности оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Формирование травмы приводило к увеличению толщины роговицы в 1,2–1,3 раза от исходных значений на 15 день. Введение К и Ф привело к уменьшению толщины роговицы, причем Ф восстанавливали толщину роговицы до дотравматического уровня на 31 день. Для исследуемых групп было зафиксировано значимое изменение индекса прозрачности роговицы к 15-ому дню после травмы. За общий период наблюдения не произошло полного восстановления индекса прозрачности ни в одной из исследуемых групп, однако более выраженное снижение индекса было при введении К.

Таким образом, введение двух клеточных популяций стромы роговицы человека оказывает терапевтический эффект на процессы репарации роговицы, но разнонаправленность динамики восстановления толщины и прозрачности роговицы требует увеличения срока наблюдения. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-25-00020.

#### Литература

1. Ghoubay D, Borderie M, Grieve K et al. Corneal stromal stem cells restore transparency after N2 injury in mice. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9:917–935.
2. Rittié L, Hutcheon AE, Zieske JD. Mouse models of corneal scarring. *Methods Mol Biol.* 2017;1627:117–122.

### EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF HUMAN CORNEAL STROMAL CELLS POPULATIONS ISOLATED FROM LENTICULAR BIOMATERIAL AFTER RELEX SMILE SURGERY ON TISSUE REPAIR PROCESSES IN THE CORNEA OPACITY MODEL

К.Ю. Краснер<sup>1,2\*</sup>, М.А. Суровцева<sup>1</sup>,  
Н.А. Бондаренко<sup>1</sup>, И.И. Ким<sup>1</sup>, Е.В. Чепелева<sup>1</sup>,  
А.Н. Трунов<sup>2</sup>, В.В. Черных<sup>2</sup>, О.В. Повещенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical and Experimental  
Lymphology — Branch of Federal Research Center  
Institute of Cytology and Genetics of SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

<sup>2</sup> S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State  
Institution of Minzdrav of Russia  
630071, Novosibirsk, Kolkhidskaya str., 10

\*e-mail: kityli@mail.ru

**Keywords:** corneal stroma cells, keratocytes, fibroblasts, Relex Smile corneal regeneration.

### АССОЦИИРОВАННАЯ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ АРГОНАВТОМ НУКЛЕАЗА ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В ГЕНЕРАЦИИ ГИДОВЫХ РНК

Е.В. Кропочева<sup>1,2\*</sup>, А.А. Агапов<sup>2</sup>,  
Д.М. Есюнина<sup>1,2</sup>, А.В. Кульбачинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»  
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

\* e-mail: katerinakropocheva@yandex.ru

**Ключевые слова:** программируемые нуклеазы, прокариотические белки-аргонауты, гидовые РНК.

Белки-аргонауты прокариот составляют крупную и разнообразную группу программируемых нуклеаз, использующих короткий олигонуклеотид в качестве гида для распознавания и специфического расщепления мишени. В отличие от аргонаутов эукариот, которые участвуют в РНК-интерференции и работают с РНК, большинство исследованных аргонаутов прокариот являются ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами [1]. Однако описаны группы аргонаутов, способных расщеплять РНК-мишени с использованием ДНК-гида [2] и наоборот [3].

Мы обнаружили ранее не описанную группу аргонаутов прокариот, имеющих строгое предпочтение к РНК-гидам и ДНК-мишеням. Подробное исследование активности представителя этой группы *in vitro* показало, что успешное расщепление мишени происходит при использовании нефосфорилированных по 5'-концу РНК длиной от 16 нуклеотидов. Важным условием является наличие аденина на 5'-конце гида. Такая избирательность по отношению к гидовым РНК может указывать на наличие особого механизма их биогенеза.

В одном опероне с аргонаутами данной группы закодирована РНК-нуклеаза, имеющая HEPN-домен. Секвенирование продуктов расщепления геномной РНК этой нуклеазой показало, что разрыв вносится между остатками G и A. При этом продукты расщепления могут использоваться аргонаутом в качестве гидов. При одновременной экспрессии аргонаута и нуклеазы в клетках *E. coli* с аргонаутом связываются короткие гидовые РНК и более длинные ДНК, вероятно, соответствующие узнаваемым мишеням. Связывание коротких РНК аргонаутом не зависит от его каталитической активности, но исчезает при внесении мутации в активный центр HEPN-нуклеазы.

Изучение механизма генерации гидов в системе прокариотических аргонаутов позволит понять их функции в защите бактерий от чужеродных НК и определить перспективы их использования в качестве программируемых нуклеаз в живых системах. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение 075-15-2021-1062).

#### Литература

1. Lisitskaya L, Kropocheva E, Agapov A et al. Bacterial Argonaute nucleases reveal different modes of DNA targeting *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(10):5106–5124.
2. Lisitskaya L, Shin Y, Agapov A et al. Programmable RNA targeting by bacterial argonaute nucleases with unconventional guide binding and cleavage specificity. *Nat Commun.* 2022;13:4624.
3. Kaya E, Doxzen KW, Knoll KR et al. A bacterial argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:4057–4062.

### HEPN-NUCLEASE PARTICIPATES IN BIOGENESIS OF GUIDE RNAs USED BY A PROKARYOTIC ARGONAUTE PROTEIN

E.V. Kropocheva<sup>1,2\*</sup>, A.A. Agapov<sup>2</sup>,  
D.M. Esyunina<sup>1,2</sup>, A.V. Kulbachinskiy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy  
of Sciences

119334, Moscow, str. Vavilov, 34/5

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute"  
123182, Moscow, Kurchatov sq. 2

\* e-mail: katerinakropocheva@yandex.ru

**Keywords:** programmable nucleases, prokaryotic argonautes, guide RNA.

### МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ CRISPR- НУКЛЕАЗЫ Cas12A ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАТОГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ DETECTR

Л.К. Курбатов<sup>1\*</sup>, С.А. Хмелева<sup>1</sup>, О.С. Тимошенко<sup>1</sup>,  
К.Г. Птицын<sup>1</sup>, С.П. Радько<sup>1,2</sup>, А.В. Лисица<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича  
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

<sup>2</sup> Тюменский государственный университет,  
Западно-Сибирский межрегиональный научно-  
образовательный центр  
625000, Тюмень, ул. Республики, 142

\* e-mail: kurbatovl@mail.ru

**Ключевые слова:** очистка белка, CRISPR/Cas нуклеаза Cas12a, DETECTR, фитопатогены.

Технология DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR *trans* reporter) для высокоселективной и высокочувствительной ДНК-диагностики различных инфекционных агентов основана на комбинации рекомбиназной полимеразной амплификации ДНК с детекцией целевых ампликонов комплексом CRISPR/Cas нуклеазы Cas12a (Cpf1) с направляющей РНК (нРНК). После узнавания комплексом участка-мишени в амплифицированной последовательности Cas12a-нуклеаза приобретает так называемую коллатеральную (неспецифическую) нуклеазную активность в отношении любых фрагментов однонитевой ДНК. Добавление в реакционную смесь коротких ДНК-олигонуклеотидов, меченых флуорофором и тушителем (репортёры) позволяет детектировать появление такой активности либо по изменению интенсивности флуоресценции, либо в формате тест-полоски, если тушитель в репортёре заменён на биотин.

Стандартная схема очистки Cas12a-нуклеазы включает стадии аффинной, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, а также дополнительные этапы энзиматического отщепления N-концевых тагов и диализа. Нами установлено, что функционально активная Cas12a-нуклеаза может быть получена путем упрощенной одностадийной очистки, основанной на металл-хелатной хроматографии без последующего удаления тагового участка. Кроме того, смена буфера на последнем этапе очистки белка может быть эффективно проведена с помощью центрифужных концентраторов вместо диализа, что позволяет сократить время процедуры, в целом, до одного рабочего дня. Препараты

Cas12a-нуклеазы, полученные таким способом, обладали удельной коллатеральной активностью лишь в два раза меньшей, чем коммерческая нуклеаза LbaCas12a (New England Biolabs). Эффективность препаратов Cas12a-нуклеазы для использования в технологии DETECTR была продемонстрирована на примере детекции ряда фитопатогенов, вызывающих бактериозы картофеля, причиняющие существенный экономический ущерб промышленному картофелеводству. Тестирование показало возможность обеспечить при их использовании в DETECTR требуемую селективность и чувствительность (на уровне нескольких копий бактериальных геномов в тестовой пробе) детекции. При этом определение результата теста может быть проведено визуально по люминесценции реакционного раствора в стандартной ПЦР-пробирке при её облучении синим светом. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF---193021X0012).

#### MODIFIED METHOD OF PURIFICATION OF RECOMBINANT CRISPR NUCLEASE Cas12A FOR IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENS WITH DETECTR TECHNOLOGY

L.K. Kurbatov<sup>1\*</sup>, S.A. Khemeleva<sup>1</sup>, O.S. Timoshenko<sup>1</sup>, K.G. Ptitsyn<sup>1</sup>, S.P. Radko<sup>1,2</sup>, A.V. Lisitsa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> N.V. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry  
119121, Moscow, 10 Pogodinskaya street

<sup>2</sup> University of Tyumen, West Siberia Interregional  
Research and Educational Center  
625000, Tyumen, 142 Respubliki street

\*e-mail: kurbatov@mail.ru

**Keywords:** protein purification, CRISPR nuclease Cas12a, DETECTR, phytopathogens.

#### СОЗДАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА С СОРТОСПЕЦИФИЧНЫМИ ПРОМОТОРАМИ U6 ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РОССИЙСКИХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM*)

K.T. Larichev<sup>1,2\*</sup>, E.M. Sergeeva<sup>1,2</sup>,  
D.I. Karetnikov<sup>1,2</sup>, D.A. Afonnikov<sup>1,2</sup>,  
E.A. Salina<sup>1,2</sup>, A.V. Kochetov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Курчатовский геномный центр Института цитологии  
и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** картофель, CRISPR\Cas9, промотор U6.

Картофель *Solanum tuberosum* является четвертой по значимости сельскохозяйственной культурой в мире, в связи с этим получение новых сортов с заданными признаками является актуальной задачей. Однако получение сортов методами классической селекции является затрудненным и трудоемким, поскольку картофель

является растением с высоко гетерозиготным, автотетраплоидным геномом и инбредной депрессией. Активно развивающиеся в последнее время методы геномной инженерии способны преодолеть эти затруднения и успешно применяются для получения растений картофеля с заданными признаками.

Цель нашей работы — разработка плазмидного вектора для эффективного редактирования геномов российских сортов картофеля системой CRISPR/Cas9. Для экспрессии направляющих РНК использованы сортоспецифичные промоторы малой ядерной РНК U6 сортов Невский и Удача. Для определения последовательностей промоторов U6 сортов Невский и Удача были использованы геномные сборки сортов, полученные по данным секвенирования Illumina. Последовательности были найдены с помощью алгоритма BLASTn, в качестве референсных использовались следующие последовательности промотора U6 картофеля из базы данных GenBank: Z17290, Z17292, Z17293, Z17301. Каждый обнаруженный вариант промотора (район длиной 400 п.н. в направлении 5' относительно гена U6) был амплифицирован с помощью ПЦР.

Направляющая РНК ранее была использована для нокаута гена *GBSS* (крахмалсинтаза связанная с гранулой) картофеля [1]. Сборка кассеты для экспрессии направляющих РНК в картофеле осуществлялась на основе плазмиды pAtU6-sgRNA. Было получено несколько кассет для экспрессии направляющей РНК, различающихся вариантом промотора U6. Кассеты были лигированы в бинарный вектор pUDE-35S-Cas9-mCherry, кодирующий белок Cas9, который находится под промотором 35S. Чтобы определить, какой промотор обеспечивает максимальную эффективность, полученные векторы использовались для ПЭГ-опосредованной трансфекции протопластов картофеля сортов Невский и Удача. Для определения эффективности редактирования гена *GBSS* проведена ПЦР-амплификация и последующее секвенирование фрагментов гена *GBSS* из суммарной ДНК культуры протопластов. Эта работа выполнена в рамках Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).

#### Литература

- Andersson M, Tureson H, Nocolia A et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2017;36:117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3.

#### DESIGN OF PLASMID VECTOR WITH CULTIVAR SPECIFIC U6 PROMOTERS FOR GENOME EDITING OF RUSSIAN POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*) CULTIVARS

K.T. Larichev<sup>1,2\*</sup>, E.M. Sergeeva<sup>1,2</sup>, D.I. Karetnikov<sup>1,2</sup>, D.A. Afonnikov<sup>1,2</sup>, E.A. Salina<sup>1,2</sup>, A.V. Kochetov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentyev Prospekt, 10

<sup>2</sup> Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentyev Prospekt, 10

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

**Keywords:** potato, CRISPR\Cas9, U6 promoter.

## ТКАНЕВОЙ УРОВЕНЬ $O_2$ IN VITRO КАК МОДУЛЯТОР ИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Д.К. Матвеева<sup>1\*</sup>, Е.Р. Андреева<sup>1</sup>,  
Л.Б. Буравкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНЦ РФ- ИМБП РАН  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

\*e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru

**Ключевые слова:** физиологическая гипоксия, внеклеточный матрикс, мезенхимальные стромальные клетки, остеоккоммитирование.

Различные компоненты микроокружения определяют свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Внеклеточный матрикс (ВКМ) регулирует различные процессы, образуя молекулярную сеть вокруг клеток. Другим неклеточным фактором ниши МСК является пониженный уровень  $O_2$ . Данные протеомных и полногеномных исследований указывают на значение уровня  $O_2$  в формировании матрикса. Изучение активности ВКМ, получаемого от МСК при различных уровнях  $O_2$ , крайне актуально с точки зрения понимания механизмов регуляции локального микроокружения.

МСК из жировой ткани человека постоянно культивировали при 20 или 5%  $O_2$ . После 14 дней монослои децеллюляризировали с помощью 0,5% Triton-X100 + 20 mM  $NH_4OH$  в PBS, получая дцВКМ (далее 20% $O_2$ - и 5% $O_2$ -дцВКМ). МСК высевали на препараты дцВКМ и культивировали 7 дней при 20%  $O_2$  с добавлением или без индукторов остеодифференцировки. Далее оценивали активность щелочной фосфатазы (ЩФ), относительную экспрессию генов *ALPL*, *RUNX2*, *COL1A1* и профиль цитокинов.

После 7 суток рецеллюляризации МСК на дцВКМ имели более выраженную фибробластоподобную морфологию и активнее пролиферировали по сравнению с МСК на покрытии из коллагена. Увеличение активности ЩФ в МСК на дцВКМ свидетельствовало об усилении спонтанного остеоккоммитирования по сравнению с коллагеном, при этом эффект на 20% $O_2$ -дцВКМ был более выражен. При добавлении индукторов остеодифференцировки значительно усиливалась активность ЩФ в МСК, но разница между дцВКМ, полученными при разном уровне  $O_2$ , нивелировалась. Было выявлено усиление экспрессии *ALPL*, *RUNX2* и снижение *COL1A1* в МСК после остеоиндукции. При этом на 5% $O_2$ -дцВКМ кратность отличий была выше, чем на 20% $O_2$ -дцВКМ. Данные изменения указывают на то, что МСК на 5% $O_2$ -дцВКМ чувствительнее к остеостимулам, чем на 20% $O_2$ -дцВКМ. Профиль секреторируемых цитокинов МСК, таких как IL-6, MCP-1-, MCP-3, не зависел от типа подложки. По сравнению с 20% $O_2$ -дцВКМ, на 5% $O_2$ -дцВКМ снижалась секреция FGF-2 и увеличивалась продукция IL-8, а также GRO- $\alpha$  и зотаксина.

Таким образом, тканевой уровень кислорода является важным фактором для модуляции свойств МСК-образуемого ВКМ *in vitro*. Полученные данные могут быть перспективными для разработки протоколов регенеративной медицины и тканевой инженерии. Исследование выполнено за счет гранта РФФ № 23-15-00062.

## TISSUE $O_2$ LEVEL IN VITRO AS A MODULATOR OF THE INDUCTIVE PROPERTIES OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS EXTRACELLULAR MATRIX

D.K. Matveeva<sup>1\*</sup>, E.R. Andreeva<sup>1</sup>, L.B. Buravkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Problems of RAS  
123007, Moscow, Khoroshevskoe shosse, 76A

\*e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru

**Keywords:** physiological hypoxia, extracellular matrix, mesenchymal stromal cells, osteocommitment.

## ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ RIPK3 В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ TGF- $\beta$ — ПРОТИВОРЕЧИВЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

Е.И. Моргун<sup>1\*</sup>, М.С. Шитова<sup>1</sup>, С.А. Шелер<sup>1</sup>,  
И.С. Изюмов<sup>1</sup>, Е.П. Калабушева<sup>1</sup>,  
О.Л. Черкашина<sup>1</sup>, Е.А. Воротеяк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биологии развития им.  
Н.К. Кольцова РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

\*e-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

**Ключевые слова:** RIPK3, TGF- $\beta$ , фибробласты, дерма, фиброз.

Заживление кожных ран — динамичный процесс, объединяющий клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы, их нарушение ведет к аномалиям регенерации. Одной из насущных проблем регенеративной медицины является образование гипертрофированных рубцов и келоидов. Известно, что протеинкиназа RIPK3 участвует в некроптозе, однако в последнее время появляются данные в пользу её неканонических функций, в т.ч. об участии RIPK3 в развитии фиброза почек. Согласно данным Imamura, в фибробластах эмбриона мыши линии NIH 3T3 происходило дозозависимое увеличение экспрессии RIPK3 под воздействием TGF- $\beta$  — известного индуктора фибротических процессов [1]. В предварительных экспериментах нашей лаборатории было показано, что количество Vimentin+RIPK3+ клеток в раневом ложе мыши было достоверно выше, чем в дерме мыши в норме. Также было доказано, что RIPK3+ клетки раневого ложа и дермы мыши являются фибробластами. Поэтому целью работы было изучение экспрессии RIPK3 в культуре дермальных фибробластов человека под воздействием TGF- $\beta$ .

Фибробласты человека культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина и 1% пенициллин-стрептомицина. Далее фибробласты переводили на среду Opti-MEM с 1% эмбриональной телячьей сыворотки, после чего через 60 минут клетки переводили в среду, содержащую TGF- $\beta$  в дозах 0.1; 1; 2; 5; 10 нг/мл. Через 24 часа клетки были окрашены антителами против RIPK3 по стандартному протоколу лаборатории. Далее был проведен повтор эксперимента, отличавшийся тем, что клетки переводили на среду, содержащую TGF- $\beta$  в двух дозах: 1; 10 нг/мл. Через 24 часа из клеток была выделена РНК, проведен синтез кДНК и RT-PCR на *Ripk3* и на маркеры активации фибробластов: *Col1a*, *FAP* и *Fn1*.

Анализ фибробластов человека, окрашенных антителами против RIPK3, показал увеличение интенсивности флуоресценции под воздействием TGF- $\beta$  в концентрациях 0,1, 1, 2, 5, 10 нг/мл, по сравнению с контролем. В то же время уровень экспрессии *Ripk3* и маркеров активации фибробластов на уровне мРНК под воздействием TGF- $\beta$  достоверно не отличались от контроля.

Полученные результаты нуждаются в обсуждении дополнении в части моделирования активации фибробластов во время ранозаживления в норме и при патологии. Работа выполнена в рамках проекта № 21-74-30015 Российского научного фонда.

#### Литература

1. Imamura M et al. RIPK3 promotes kidney fibrosis via АКТ-dependent ATP citrate lyase. *JCI Insight*. 2018;3(3):e94979. doi: 10.1172/jci.insight.94979.

### EXPRESSION PATTERNS OF RIPK3 UNDER THE INFLUENCE OF TGF- $\beta$ IN HUMAN FIBROBLASTS — THE CONTROVERSIAL RESULT

E.I. Morgun<sup>1\*</sup>, M.S. Shytova<sup>1</sup>, S.A. Sheleg<sup>1</sup>, I.S. Izumov<sup>1</sup>, E.P. Kalabusheva<sup>1</sup>, O.L. Cherkashina<sup>1</sup>, E.A. Vorotelyak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences  
119334, Moscow, 26 Vavilova str.

\*e-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

**Keywords:** RIPK3, TGF- $\beta$ , fibroblasts, dermis, fibrosis.

### ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПОЗИТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ АТОМАМИ МЕДИ И/ИЛИ ГАЛЛУАЗИТОМ

Т.Ф. Насибов<sup>1\*</sup>, Е.Д. Порохова<sup>1</sup>, А.В. Горохова<sup>1</sup>, А.Н. Дзюман<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
634050, Томск, Московский тракт, 2

\*e-mail: temur.nsbv@gmail.com

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, биоинженерия кости, медицинское материаловедение.

Различные модификации кальцийфосфатных покрытий (КФП) на костных имплантатах, используются для увеличения их биосовместимости и остеогенного потенциала, а также для придания антибактериальных свойств [1].

Целью исследования стало определение остеогенного потенциала композитных имплантатов с КФП, модифицированным атомами Си и/или галлуазитом.

Для эксперимента в ООО «НПК «СИНТЕЛ» (Томск) на 3D-принтере были изготовлены титановые подложки, на которые наносили микродуговое КФП в модификациях: стехиометрический гидроксипатит (ГАП); ГАП

с введением в структуру атомов меди (ГАП+Си) или нанотрубок галлуазита (ГАП+Г); ГАП с введением в структуру атомов меди и нанотрубок галлуазита (ГАП+Си+Г). Исследование проводили на 24 самцах мышей линии Balb/c. Часть мышей (n=8) использовали для получения костного мозга (КМ) из бедренной кости. КМ наносили на подложки и культивировали перед имплантацией *in vitro* в течение 45 минут. Остальным животным (n=16) подкожно в подмышечную область имплантировали подложку с КФП и нанесенным КМ. Таким образом было сформировано 4 группы (n=4): ГАП; ГАП+Си; ГАП+Г, ГАП+Си+Г. Через 45 дней животных выводили из эксперимента, имплантаты извлекали, с их поверхности снимали тканевые пластинки (ТП). На гистологических препаратах ТП оценивали биосовместимость имплантатов и способность стимулировать образование костной ткани (КТ) с КМ, а также подсчитывали удельные площади (УП) КТ и КМ. Статистическую обработку данных производили в программе Statistica 13 при помощи критерия Краскела-Уоллиса.

В результате гистологического исследования тканей, окружавших имплантаты, во всех случаях не наблюдалось признаков воспалительных или деструктивных изменений, что свидетельствует о биосовместимости тестируемых образцов. Снаружи все образцы были покрыты соединительнотканной капсулой, под которой находились ТП, состоящие из участков КТ с полостями, заполненными КМ, и участков волокнистой соединительной и жировой тканей. Формирование КТ и КМ во всех группах наблюдалось одинаково часто (в 75% случаев). Во всех группах с модифицированным ГАП (ГАП+Си, ГАП+Г и ГАП+Си+Г) было обнаружено значимое уменьшение УП КТ и УП КМ в сравнении с соответствующими значениями в контрольной группе ГАП. Среди всех модифицированных покрытий в группе ГАП+Г наблюдались максимальные значения УП КТ и КМ. При этом наименьшее значение УП КТ наблюдалось в группе ГАП+Си+Г, а наименьшее значение УП КМ — в группе ГАП+Си. Стоит отметить, что между группами ГАП+Си и ГАП+Си+Г не было выявлено достоверных отличий в значениях УП КТ и УП КМ. Таким образом, модификация атомами меди и/или галлуазитом КФП имплантатов не способствует усилению их остеогенных свойств, по сравнению с классическим покрытием из ГАП.

#### Литература

1. Khlusov IA et al. Scaffolds as carriers of drugs and biological molecules for bone-tissue bioengineering. *Cell and Tissue Biology*. 2022;16(5):412–433.

### OSTEOGENIC POTENTIAL OF COMPOSITE IMPLANTS WITH CALCIUM PHOSPHATE COATING MODIFIED WITH COPPER ATOMS AND/OR HALLOYSITE

T.F. Nasibov<sup>1\*</sup>, E.D. Porokhova<sup>1</sup>, A.V. Gorokhova<sup>1</sup>, A.N. Dzuman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Siberian State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
634050, Tomsk, Moskovsky Trakt, 2

\*e-mail: temur.nsbv@gmail.com

**Keywords:** regenerative medicine, bone bioengineering, medical materials science.

## СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

**В.С. Овечкина<sup>1,2\*</sup>, П.С. Суворова<sup>1,3</sup>,  
С.К. Андрианова<sup>1,3</sup>, А.А. Можжаев<sup>1,2,3,4</sup>,  
В.В. Белоусов<sup>1,2,5</sup>**

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им.  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский  
медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

<sup>3</sup> Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики»  
101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 20

<sup>4</sup> ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН  
119333, Москва, Ленинский просп., д. 59

<sup>5</sup> ФГБУ «Федеральный центр мозга  
и нейротехнологий» ФМБА  
117513, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 10

\*e-mail: Vs\_ovechkina@mail.ru

**Ключевые слова:** термогенетика, ИПСК, CRISPR/Cas9.

Термогенетика является перспективным и инновационным методом изучения активности возбудимых клеток и тканей. Основанная на термочувствительных каналах семейства TRP термогенетика позволяет преодолеть сложности, с которыми сталкивается исследователь при применении оптогенетики и хемогенетики. Например, температурное воздействие на каналы TRP вызывает мгновенный ответ, который не зависит от распространения лиганда в организме, а также позволяет выполнять точный нагрев без инвазивного вмешательства.

Несмотря на то что уже показана возможность применения термогенетики для изучения активности нейронных тканей [1–2] и секретирующих клеток [3], на данный момент сложно оценить перспективы использования этой системы в тканях и клетках человека. Для того чтобы рассмотреть возможность применения термогенетических подходов в разных клетках и тканях человека, мы решили создать молекулярно-клеточные инструменты на основе TRP белков, конститутивно экспрессирующихся в линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от условно здорового пациента.

В качестве молекулярного инструмента мы использовали векторные конструкции двух типов. Вектор, который кодирует компоненты CRISPR/Cas9 системы, вносит разрывы в AAVS1 локус в геноме человека. Второй вектор участвует в гомологичной рекомбинации полученного разрыва и кодирует термочувствительный белок семейства TRP и флуоресцентный сенсор GCaMP6s. Данный сенсор позволяет визуализировать динамику внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, которая отражает адекватный клеточный ответ на открытие термочувствительного канала. С помощью этих векторов мы создадим клеточную линию ИПСК, которая конститутивно экспрессирует как канал, так и сенсор. Благодаря тому, что эти белки находятся под неспецифическим промотором CAG, стволовые клетки могут быть дифференцированы в разных направлениях, что позволит нам с большей эффективностью изучать активность широкого спектра человеческих клеток.

### Литература

1. Ermakova YG, Lanin AA, Zheltikov AM, Belousov VV. Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution. *Nat Commun.* 2017;8:15362. doi: 10.1038/ncomms15362.

2. Roshchin M, Ermakova YG, Lanin AA et al. Thermogenetic stimulation of single neocortical pyramidal neurons transfected with TRPV1-L channels. *Neurosci Lett.* 2018;687:153–157. doi: 10.1016/j.neulet.2018.09.038.
3. Ermakova YG, Belousov VV. Thermogenetic control of Ca<sup>2+</sup> levels in cells and tissues. *BioRxiv.* 2023. doi: 10.1101/2023.03.22.533774.

## GENERATION OF MOLECULAR-CELL TOOLS FOR THERMOGENETIC STIMULATION OF HUMAN CELLS

**V.S. Ovechkina<sup>1,2\*</sup>, P.S. Suvorova<sup>1,3</sup>,  
S.K. Andrianova<sup>1,3</sup>, A.A. Mozhaev<sup>1,2,3,4</sup>,  
V.V. Belousov<sup>1,2,5</sup>**

<sup>1</sup> Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
117997, Moscow, 16/10 Miklukho-Maklaya St.

<sup>2</sup> Russian National Pirogov Medical Research  
University  
117997, Moscow, 1 Ostrovitjanova St.

<sup>3</sup> Higher School of Economics National Research  
University  
101000, Moscow, 20 Myasnitskaya St.

<sup>4</sup> Federal Scientific Research Centre «Crystallography  
and Photonics», Russian Academy of Sciences  
119333, Moscow, 59 Leninskij prospect

<sup>5</sup> Federal Center for Brain and Neurotechnology,  
Federal Medical and Biological Agency  
117513, Moscow, 1-10 Ostrovitjanova str.

\*e-mail: Vs\_ovechkina@mail.ru

**Keywords:** thermogenetics, iPSC, CRISPR/Cas9.

## КОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ КОЛЛАГЕНА: НОВЫЙ ПОДХОД К ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК

**Е.О. Осидак<sup>1,2\*</sup>, А.Ю. Андреев<sup>1,3,4</sup>,  
Я. Юй<sup>3</sup>, О.С. Роговая<sup>5</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>5</sup>,  
С.П. Домогатский<sup>1,6</sup>**

<sup>1</sup> ООО фирмы «Имтек»  
121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
глазных болезней»  
119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11 А,Б

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный  
медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России

<sup>5</sup> ФГБУ «Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова» РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>6</sup> ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова»  
МЗ РФ Минздрава России  
121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А

\*e-mail: egorosidak@gmail.com

**Ключевые слова:** Viscoll, трансплантация клеток, БМКП, регенеративная медицина.

Проблема нехватки донорских органов для пересадки заставляет искать биомедицинские решения, не требующие использования донорского материала. Клеточная терапия даёт большие надежды для лечения



большого количества различных дегенеративных заболеваний. Суть данного подхода заключается в восстановлении целостности и функций тканей и органов путём локального введения биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), состоящих из клеток, способных формировать внеклеточный матрикс самостоятельно. Однако существует множество препятствий, которые затормаживают развитие и внедрение клеточной терапии в клинику. К таким препятствиям относятся, например, выбор способа доставки клеток для обеспечения оптимальной эффективности, поскольку плохое приживание клеток, как и их низкая выживаемость после трансплантации являются серьёзными проблемами требующего решения. Благодаря уникальным свойствам биологической совместимости нативный коллаген является наиболее перспективным материалом для создания матрикса, который может быть использован для трансплантации клеток. Однако коммерчески доступные в настоящее время препараты коллагена образуют механически непрочные гидрогели, требующей химической сшивки, зачастую несовместимой с находящимися внутри клетками.

В основе нашего подхода к созданию матрикса для трансплантации клеток лежит отказ от использования любых химических сшивок, ввиду того что они могут как ухудшать биосовместимость всего трансплантата, так и затруднять процесс васкуляризации материала после имплантации. Поэтому для усиления биомеханических характеристик материала мы использовали концентрированные растворы коллагена Viscoll.

Было продемонстрировано, что матрикс приготовленный из концентрированного раствора коллагена с инкапсулированными фибробластами человека не уступает матриксу, приготовленному из менее концентрированных растворов коллагена с точки зрения выживаемости, морфологии и экспрессии этими клетками характерных маркеров *in vitro*. А с другой стороны, такие матриксы являются более стабильными и удобными для проведения хирургических манипуляций, ввиду отсутствия видимой контракции, так как слишком сильная контракция является основным недостатком для использования их в регенеративной медицине.

В серии *in vivo* экспериментов в модели лимбальной недостаточности у кроликов при трансплантации лимбальных стволовых клеток кролика, находящихся внутри плотных коллагеновых гелей, был продемонстрирован как высокий уровень выживаемости клеток после трансплантации, так и сохранение их функциональной активности, заключающейся в восстановлении эпителиальных слоёв роговицы кролика и ее прозрачности.

Принимая во внимание полученные результаты в данных работах, можно сделать вывод о большом потенциале использования концентрированных растворов коллагена Viscoll для трансплантации клеток.

## MATRIX-ASSOCIATED CELL TRANSPLANTATION WITH CONCENTRATED COLLAGEN HYDROGELS

E.O. Osidak<sup>1,2\*</sup>, A.Yu. Andreev<sup>1,3,4</sup>, Yu Yang<sup>3</sup>, O.S. Rogovaya<sup>5</sup>, E.A. Vorotelyak<sup>5</sup>, S.P. Domogatsky<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Imtek Ltd.

121552, Moscow, Akademika Chazova st., 15A

<sup>2</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology Ministry of Health of the Russian Federation 117997, Moscow, 1 Samory Mashela str.

<sup>3</sup> Research Institute of Eye Disease

119021, Moscow, 11A Rossolimo St.

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation 119991, Moscow, 8-2 Trubetskaya Str.

<sup>5</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Science

119334, Moscow, Vavilov st., 26

<sup>6</sup> FSBI «NMRCC named after academian E.I. Chazov»

Ministry of Health of the Russian Federation

121552, Moscow, Akademika Chazova st., 15A

\*e-mail: egorosidak@gmail.com

**Keywords:** Viscoll, matrix associated cell transplantation, regenerative medicine.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ РЕАКЦИИ *IN VITRO* НА СЕЛЕКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ ПРОКАРИОТ

В.А. Пантелеев<sup>1,2,3\*</sup>, Е.В. Кропачева<sup>1,2</sup>, Д.М. Есюнина<sup>1,2</sup>, А.В. Кульбачинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН

119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

<sup>3</sup> МФТИ

117303, Москва, ул. Керченская, д. 1А, корп. 1

\*e-mail: panteleev.va@phystech.edu

**Ключевые слова:** белки-аргонавты, программируемые нуклеазы, мисматчи, селективность.

Прокариотические белки-аргонавты представляют собой нуклеазы, использующие короткие гидовые нуклеиновые кислоты для поиска и разрезания комплементарных мишеней. Доказана роль аргонавтов в защите бактерий от мобильных генетических элементов, на их основе разработаны различные биотехнологические методы. В том числе, аргонавты используются для детекции нуклеиновых кислот, несущих мутации, что важно для диагностики и медицины. Эти методы полагаются на различную эффективность узнавания и разрезания мишеней аргонавтом в зависимости от их степени комплементарности гидовым молекулам. В то же время влияние условий реакции, в частности, температуры, на активность аргонавтов и их селективность по отношению к мишеням, несущим нуклеотидные замены, исследовано не было.

В нашей работе был выделен белок-аргонавт из термофильной бактерии *Thermobrachium celere* (TseAgo), исследованы его биохимические характеристики и проверено влияние мисматчей между гидом и мишенью на активность аргонавта при разных температурах. Показано, что TseAgo использует ДНК-гиды для разрезания ДНК-мишеней, обладает максимальной активностью при температурах 55–70°C, использует катионы Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>,

предпочтительно связывает 5'-фосфорилированные гиды и способен специфически разрезать двуцепочечную мишень. Изучено влияние замен в различных положениях гида на эффективность разрезания мишени. Установлено, что однонуклеотидные замены в центральной части гида наиболее сильно снижают скорость реакции. При этом мисматчи имеют меньший эффект при 25°C по сравнению с 70°C, в результате чего различия в узнавании «правильных» и «неправильных» мишеней оказываются значительно снижены при низких температурах.

Таким образом, показано, что эффект мисматчей на разрезание ДНК зависит от условий проведения реакции и селективность аргонавта повышается при высоких температурах. Можно предположить, что подобные эффекты могут наблюдаться и для различных типов CRISPR-Cas нуклеаз, что еще предстоит исследовать. Возможные изменения специфичности нуклеаз при изменении температуры необходимо учитывать при их использовании для диагностики и геномной инженерии. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1062).

### INFLUENCE OF THE *IN VITRO* REACTION CONDITIONS ON THE SELECTIVITY OF PROKARYOTIC ARGONAUTE PROTEINS

V.A. Panteleev<sup>1,2\*</sup>, E.V. Kropocheva<sup>1,2</sup>,  
D.M. Esyunina<sup>1,2</sup>, A.V. Kulbachinskiy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

119334, Moscow, str. Vavilov, 34/5

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute"

123182, Moscow, Kurchatov sq., 2

\*e-mail: panteleev.va@phystech.edu

**Keywords:** Argonaute proteins, programmable nucleases, mismatches, selectivity.

### ВЛИЯНИЕ ДОЗИРОВАННОЙ ДВИГАТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

Е.А. Плотникова<sup>1\*</sup>, Э.Ф. Давлетшин<sup>1</sup>,  
Д.К. Сабиров<sup>1</sup>, А.В. Тимофеева<sup>1</sup>, Р.Р. Шигапова<sup>1</sup>,  
Т.В. Агеева<sup>1</sup>, Я.О. Мухамедшина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет

420012, Казань, ул. Бутлерова, д. 49

\*e-mail: Liza.plotnikovaO@gmail.com

**Ключевые слова:** Травма спинного мозга, спинной мозг, нейрорегенерация, реактивный астроцит, реабилитация.

Из-за нарастающего количества пациентов с хронической травмой спинного мозга (ТСМ) поиск эффективных терапевтических стратегий, нацеленных на борьбу с вторичными повреждениями в острой фазе болезни, является актуальным. В протоколах лечения ТСМ реабилитационный двигательный тренинг играет важную роль, однако его механизмы все еще требуют дополнительного изучения.

В исследовании было оценено влияние нейрореабилитации на структурно-функциональные признаки восстановления двигательной функции при мягкой контузионной ТСМ у 64 белых лабораторных крыс. Проведение теста BBB после ТСМ дало результаты, подтверждающие улучшение неврологических показателей в период от 10 до 35 дней после травмы. В хроническом периоде двигательный тренинг оказал незначительное влияние на восстановление двигательной активности. Также двигательная функция животных была оценена методом стимулированной электромиографии: анализ амплитуды М- и Н-волн в межгрупповых сравнениях выявил статистически значимое увеличение значений амплитуды М-ответа на 7 неделю, по сравнению с 3 неделей, вне зависимости от проведения реабилитации. Амплитуда Н-ответа также увеличивалась на 7 неделю, но не достигла уровня интактных животных. Изменения латентности М- и Н-волн между группами не прослеживались. При помощи иммунофлуоресцентного анализа было показано увеличение в 2 раза GFAP<sup>+</sup>/ALDH1L1<sup>+</sup> астроцитов в вентральных рогах спинного мозга и в области кортикоспинального тракта в 1,4 раза на 3 неделю реабилитации. Анализ количества ChAT<sup>+</sup>-нейронов не выявил значительных различий между животными в исследуемых группах. Однако количество клеток, экспрессирующих OPN, увеличилось после травмы спинного мозга в обеих группах, с небольшим преимуществом в реабилитированной группе, что указывает на улучшение состояния перинейрональной сети. Кроме того, был выполнен количественный анализ экспрессии генов *c3*, *gfap*, *chat*, *syp*, *acan*, *ng2* и *iba1* в области травмы Th8 и на расстоянии 3–5 мм рострально и каудально от нее у животных на 3 и 7 неделю реабилитации. Увеличение экспрессии генов *gfap* и *iba1* наблюдалось в реабилитированной группе. Через 3 недели после травмы было найдено увеличение экспрессии генов *acan* и *c3* на расстоянии 6–8 мм каудальнее от эпицентра травмы, что может указывать на развитие фиброза в спинном мозге. По мере того как посттравматические процессы становятся хроническими, влияние двигательной реабилитации уменьшается, требуя дополнительных методов модуляции нейропластичности. Эти результаты расширяют представления о пластичности спинного мозга, подчеркивая потенциал нейрореабилитации для улучшения морфо-функционального состояния поврежденного спинного мозга. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-75-00035.

### IMPACT OF DOSED MOTOR TRAINING ON THE MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE RAT POST-INJURED SPINAL CORD

Е.А. Плотникова<sup>1\*</sup>, Э.Ф. Давлетшин<sup>1</sup>,  
Д.К. Сабиров<sup>1</sup>, А.В. Тимофеева<sup>1</sup>, Р.Р. Шигапова<sup>1</sup>,  
Т.В. Агеева<sup>1</sup>, Я.О. Мухамедшина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Kazan Federal University

420008, Kazan, st. Kremlin, 18

<sup>2</sup> Kazan State Medical University

420012, Kazan, st. Butlerova, 49

\*e-mail: Liza.plotnikovaO@gmail.com

**Keywords:** Spinal cord injury, spinal cord, neuroregeneration, reactive astrocyte, rehabilitation.

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ НУКЛЕАЗЫ Cas12a (AsCpf1) В НАИВНЫХ И ПРАЙМИРОВАННЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Д.Е. Поливцев<sup>1,2\*</sup>, А.И. Шевченко<sup>1</sup>, С.П. Медведев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*e-mail: d.poliltsev@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** ИПСК, Cas12a (AsCpf1), изогенные линии клеток, моделирование наследственных заболеваний.

После открытия программируемых нуклеаз CRISPR/Cas редактирование генома стало рутинной операцией. С помощью системы CRISPR/Cas получено множество изогенных линий плюрипотентных клеток человека для моделирования наследственных заболеваний и сделан значительный вклад в понимание молекулярных и клеточных механизмов патогенеза. Однако до сих пор есть потребность в надежных инструментах для редактирования генома, так как наиболее популярная программируемая нуклеаза Cas9 является низкоспецифичной и способна вызывать редактирование нецелевых участков генома [1]. В качестве альтернативы рассматривают белок Cas12a (AsCpf1), обладающий более специфичной нуклеазной активностью. Помимо этого основного преимущества он создает липкие концы, что способствует внесению целевой ДНК. Кроме того, Cas12a создает двуцепочечный разрыв вдали от сайта узнавания, что позволяет использовать его для повторного редактирования одного и того же локуса. Однако у этой нуклеазы есть существенный недостаток: она менее эффективно гидролизует ДНК при редактировании генома в эукариотических клетках, а некоторые участки генома для неё недоступны, что связывают с неактивным состоянием хроматина. В данной работе проведён ряд экспериментов, которые позволяют говорить об увеличении эффективности нуклеазы Cas12a в редактировании генома при переходе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в состояние наивной плюрипотентности, соответствующей ранним стадиям преимплантационного развития эмбриона. Таким образом, использование наивных плюрипотентных клеток совместно с нуклеазой Cas12a может быть основой для более эффективного и точного редактирования генов при получении изогенных клеточных линий.

### Литература

1. Hsu PD et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 2013;9(31):827–832.

## COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF Cas122 PROGRAMMABLE NUCLEASE(AsCpf1) IN NAÏVE AND PRIMED HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

D.E. Poliltsev<sup>1,2\*</sup>, A.I. Shevchenko<sup>1</sup>, S.P. Medvedev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Federal Research Center "Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University  
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2

\*e-mail: d.poliltsev@g.nsu.ru

**Keywords:** iPSC, Cas12a (AsCpf1), isogenic cell lines, hereditary diseases modelling.

## i-GONAD (IMPROVED GENOME-EDITING VIA OVIDUCTAL NUCLEIC ACIDS DELIVERY) — НОВЫЙ МЕТОД ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Ю.В. Попова<sup>1\*</sup>, В.Д. Бец<sup>1,2</sup>, Е.Н. Кожевникова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Новосибирский государственный аграрный университет

630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Новосибирский государственный технический университет

630073, Новосибирск, пр-т К. Маркса, 20

<sup>3</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины

630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

\*e-mail: popova@mcb.nsc.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, i-GONAD, редактирование генома, электропорация, мышь, зигота, трансгенные животные.

До недавнего времени получение генно-модифицированных животных было очень длительным и дорогостоящим процессом. Все изменилось с появлением системы редактирования генома CRISPR/Cas9, позволяющей добиться высокой специфичности внесения изменений в геном. Традиционными способами доставки компонентов системы являются микроинъекция либо электропорация зигот.

Японскими учеными разработан перспективный метод с высокой эффективностью i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) [1] — редактирование генома посредством доставки нуклеиновых кислот напрямую в яйцевод. Важно, что в нем используется в ~2,5 раза меньше животных, чем при традиционных подходах, т.к. не требуется получение стерильных самцов методом вазэктомии и эвтаназии самок-доноров зигот.

Наша работа заключается в отработке и оптимизации геномного редактирования CRISPR/Cas9 методом i-GONAD. Нами протестирована возможность использования нуклеаз Cas9, доступных на отечественном рынке, в процедуре геномного редактирования *in vitro* и *in vivo*, проведено сравнение с нуклеазами от иностранных поставщиков. Отработано применение метода i-GONAD на мышах линии C57BL/6 и CD-1. В данный момент мы получаем модельную линию мышей с делецией в гене *IL10* (участвует в развитии воспалительного процесса в кишечнике). Работа поддержана грантом РФФ № 22-26-20045.

*Литература*

- Ohtsuka M, Sato M, Miura H et al. i-GONAD: a robust method for *in situ* germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biology*. 2018;19(1):25. doi: 10.1186/s13059-018-1400-x.

**i-GONAD (IMPROVED GENOME-EDITING VIA OVIDUCTAL NUCLEIC ACIDS DELIVERY) — A NEW METHOD FOR GENOME EDITING USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM**

J.V. Popova<sup>1\*</sup>, V.D. Bets<sup>1,2</sup>, E.N. Kozhevnikova<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Novosibirsk State Agrarian University*  
630039, Novosibirsk, Dobrolyubova str., 160

<sup>2</sup> *Novosibirsk State Technical University*  
630073, Novosibirsk, pr-t K. Marksa, 20

<sup>3</sup> *Scientific-Research Institute of Neurosciences and Medicine*  
630117, Novosibirsk, Timakova str., 4

\*e-mail: popova@mcb.nsc.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9, i-GONAD, genome editing, electroporation, mouse, zygote, transgenic animals.

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ В СТРУКТУРЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 IN VITRO**

Д.В. Прохорова<sup>1\*</sup>, П.О. Толстова<sup>1</sup>,  
М.С. Купрюшкин<sup>1</sup>, И.С. Довыденко<sup>1</sup>, Г.А. Степанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*  
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

\*e-mail: prohorova1994@gmail.com

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, направляющие РНК, транс-активирующие РНК, РНК/ДНК химерные crРНК, природные модификации, фосфорилгуанидиновые группы.

На сегодняшний день системы CRISPR/Cas применяются для разнообразных целей: регуляции транскрипции, изменения эпигенетического профиля, проведения полногеномного скрининга, визуализации хромосом и нокаута заданных генов-мишеней. Несмотря на преимущества использования систем CRISPR/Cas, существуют некоторые препятствия внедрения технологии геномного редактирования в практику. Проблема возникновения нецелевых эффектов при редактировании генов системами CRISPR/Cas считается одной из основных. Одним из перспективных подходов к её решению является разработка новых структур эффективных модифицированных направляющих РНК.

В данной работе было исследовано влияние как природных модифицированных нуклеотидов: т6А, т5С и Ψ, — так и фосфорилгуанидиновых групп (ФГ) на эффективность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

В ходе работы были получены серии sgРНК и tracrРНК с разной глубиной природных модифицированных мономеров, и было установлено, что оптимизация времени реакции и глубины модификации направляющих РНК позволяет достичь наибольшей эффективности гидролиза модельных ДНК-субстратов. Кроме того, замена канонических нуклеотидов на их модифицированные аналоги в направляющих РНК приводит к повышению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с немодифицированным вариантом.

Также были сконструированы и описаны новые химерные направляющие РНК, содержащие как единичные, так и несколько ФГ-групп. Впервые была продемонстрирована возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 с химерными направляющими РНК, содержащими ФГ-модификации. Было показано, что включение фосфорилгуанидиновых группировок в PAM-дистальном районе направляющих РНК позволяет сохранить высокую эффективность гидролиза ДНК-субстратов и увеличить точность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

Таким образом, использование природных модифицированных нуклеотидов и фосфорилгуанидиновых групп в структуре направляющих РНК позволяет контролировать активность и повышать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. Исследования выполнены при поддержке гранта РФ № 21-64-00017 (исследования по влиянию ФГ-модификаций) и государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7 (исследования по влиянию природных модифицированных нуклеотидов).

**INFLUENCE OF GUIDE RNA MODIFICATIONS ON THE FUNCTION OF THE CRISPR/Cas9 SYSTEM IN VITRO**

D.V. Prokhorova<sup>1\*</sup>, P.O. Tolstova<sup>1</sup>,  
M.S. Kupryushkin<sup>1</sup>, I.S. Dovydenko<sup>1</sup>, G.A. Stepanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS*  
630090, Novosibirsk, Prospekt Akademika Lavrent'eva, 8

\*e-mail: prohorova1994@gmail.com

**Keywords:** CRISPR/Cas9, guide RNAs, tracrRNAs, RNA/DNA chimeric crRNAs, natural modifications, phosphorylguanidine groups.

**МИТОМИЦИН С ИЗМЕНЯЕТ СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

А.Ю. Ратушный<sup>\*</sup>, Д.К. Матвеева, М.И. Ездакова

*ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН*  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

\*e-mail: ratushkin@mail.ru

**Ключевые слова:** мезенхимальные стромальные клетки (МСК), клеточное старение, митомицин С, секретом.

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную регуляторную роль практически во всех тканях организма человека. При активации клеточного старения после многих клеточных делений или сублетального воздействия физиология МСК может значительно измениться, а значит и их регуляторные свойства. Один из важнейших путей клеточной коммуникации — паракринное взаимодействие. В нашей работе мы оценили изменения секреторного профиля МСК при активации клеточного старения путем добавления противоопухолевого препарата митомицина С (МмС), используемого в медицине.

МмС добавляли на 18 часов (1,5 мкг/мл), анализ проводили через 10 дней после отмены. Отмечены морфофункциональные изменения, характерные для клеточного старения. Увеличивались показатели FSC-A/SSC-A (размер/гранулярность). Аутофлуоресценция возрастала, что указывает на накопление липофусцина. Активность лизосомального и митохондриального компартмента также

увеличивалась, генерация АФК возрастала в 1,5–5 раз. Полностью останавливалась пролиферативная активность. Жизнеспособность ММС+ клеток была снижена приблизительно на 10%. Экспрессия  $\beta$ -галактозидазы, ассоциированной со старением, обнаруживалась почти в 100% клеток. В целом, данные изменения соотносятся с результатами, получаемыми на модели репликативного старения, но количественно более выражены.

С помощью гистологических красителей Sirius Red и Fast Green исследовали внеклеточный матрикс (ВКМ) МСК. Для ММС+ МСК продукция коллагеновых и неколлагеновых белков была меньше. Содержание про-коллагена  $1\alpha 1$  в кондиционированной среде было значительно снижено (в 10 раз). Изучение экспрессии генов подтвердило предыдущие результаты о снижении продукции ВКМ сенесцентными МСК. Более чем в 2 раза снизилась экспрессия коллагена 1 типа, эластина и фибронектина в сенесцентных МСК, но увеличилась экспрессия коллагеназы MMP1 в 3 раза. Выявлено достоверное увеличение CTGF в экстракте дВКМ. Содержание VEGF, напротив, снижалось.

Применяли мультиплексный анализ для оценки содержания цитокинов в кондиционированной среде. Обработка ММС запускает выраженную продукцию GM-CSF, G-CSF и MIP-1a. Более чем в 2 раза повышалась концентрация MCP-3, IL-6, GRO $\alpha$ , FGF-2. Снижались FLT-3L, IP-10, IL-5. Для анализа изменений на транскрипционном уровне использовали количественный ПЦР анализ. Обработка ММС более чем в 2 раза повышает транскрипционную активность 24 генов (*IL1B*, *IL1A*, *CSF2*, *IL11*, *LIF*, *CXCL1* и др.) и снижает 13 (*PTN*, *IGF1*, *NRG2* и др.).

Таким образом, данные указывают на снижение продукции ВКМ и изменение паракринного профиля МСК при воздействии ММС и активации клеточного старения. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-75-10117.

### MITOMYCIN C CHANGES THE SECRETORY ACTIVITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

A.Yu. Ratushnyy\*, D.K. Matveeva,  
M.I. Ezdakova, L.B. Buravkova

*Institute of Biomedical Problems RAS  
123007, Moscow, Khoroshevskoe shosse, 76A*

\*e-mail: ratushkin@mail.ru

**Keywords:** mesenchymal stromal cells (MSCs), cell senescence, mitomycin C, secretome.

### РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

А. Садек<sup>1,3\*</sup>, Ю.С. Храмова<sup>1,2</sup>,  
О.В. Измestьева<sup>1</sup>, Б.Г. Юшков<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина  
620002, Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

<sup>2</sup> Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106

<sup>3</sup> Институт медицинских клеточных технологий  
620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а

\*e-mail: sadek1996@mail.ru

**Ключевые слова:** тучные клетки, сперматозоиды, семенники, температура, стресс, сперматогенез.

Известно, что высокая температура негативно влияет на функционирование мужской половой системы, приводя

к изменению параметров всех половых клеток, что может стать причиной мужского бесплодия [1]. При этом сперматогенез зависит от микроокружения клеток-предшественников, в частности от состояния тучных клеток (ТК). В связи с этим цель работы — оценить взаимосвязь сперматогенеза и ТК при воздействии высокой температуры.

Эксперимент проведен на 4 месячных крысах-самцах линии Вистар. Группы: 1) интактная, 2) экспериментальная после длительного воздействия высокой температуры (48 суток, ежедневно по 30 минут в термостате при 43–44 °С) и 3) контрольная (аналогичные условия 2 группе, но при комнатной температуре) [2]. Оценивали параметры ТК в семенниках, их придатках и семенных пузырьках, спермограмму, уровень тестостерона, морфометрические параметры семенников и сперматозоидов.

После воздействия высокой температуры происходит постепенное снижение концентрации, подвижности сперматозоидов крыс, увеличение процента клеток с дефектами в строении как в нативном эякуляте, так и в придатках. Эти данные свидетельствуют о нарушении формирования и созревания клеток на каждом этапе сперматогенеза, что приводит к уменьшению их оплодотворяющей способности. При этом в контрольной группе изменений в параметрах сперматозоидов не отмечается и это указывает на то, что негативным фактором является именно температура. При этом во всех исследованных органах наблюдается значительное увеличение количества ТК, сопровождаемое повышением их дегрануляции и снижением синтетической активности, что свидетельствует об активации ТК и их миграции в органы. Результаты расчета корреляционных коэффициентов показывают наличие взаимосвязи между параметрами тучных клеток и сперматозоидов.

Таким образом, ТК играют важную роль в функционировании репродуктивных органов и их адаптации к действию высокой температуры за счет высвобождения широкого спектра медиаторов, в том числе активирующих другие клетки микроокружения [3].

### Литература

1. Hoang-Thi AP, Dang-Thi AT, Phan-Van S et al. The impact of high ambient temperature on human sperm parameters: A meta-analysis. *Iranian Journal of Public Health*. 2022;51(4):710.
2. Durairejanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects, and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015;30(1):14–27.
3. Himelreich-Perić M, Katušić-Bojanac A, Hohšteter M et al. Mast cells in the mammalian testis and epididymis—Animal models and detection methods. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2547.

### THE ROLE OF THE MICROENVIRONMENT IN THE PATHOGENESIS OF SPERMATOGENESIS DISORDERS UNDER THE EFFECT OF HIGH TEMPERATURE

A. Sadek<sup>1,3\*</sup>, Y.S. Khramtsova<sup>1,2</sup>,  
O.V. Izmetseva<sup>1</sup>, B.G. Yushkov<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Ural Federal University  
620002, Ekaterinburg, st. Mira, 19

<sup>2</sup> Institution of Immunology and Physiology  
620049, Ekaterinburg, st. Pervomayskaya, 106

<sup>3</sup> Institution of Medical Cell Technologies  
620026, Ekaterinburg, st. Karl Marks, 22a

\*e-mail: sadek1996@mail.ru

**Keywords:** mast cells, spermatozoa, testes, temperature, stress, spermatogenesis.

## 2'-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СИСТЕМЫ CRISPR/ Cas9 С УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Л.В. Саковина<sup>1,2\*</sup>, Е.А. Ахметова<sup>1</sup>, Д.С. Новопашина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\* e-mail: kodi@list.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, направляющие РНК, 2'-модифицированные РНК, фоторегуляция, специфичность, эффективность.

Создание контролируемых систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, обладающих высокой эффективностью расщепления и специфичностью по отношению к ДНК-мишени, является актуальной задачей. Перспективным подходом к созданию таких систем является дизайн направляющих РНК, активность которых можно регулировать путем облучения светом.

Введение в состав направляющих РНК химических модификаций позволяет повысить устойчивость направляющих РНК к действию нуклеаз, их сродство к целевой ДНК-мишени, а также специфичность действия системы. Фоточувствительные модификации РНК позволяют регулировать функциональную активность CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК путем облучения светом. Идея данной работы заключается в создании системы CRISPR/Cas9, способной обеспечить быстрое, эффективное и специфичное расщепление ДНК-мишени, с возможностью инактивации системы при УФ-облучении.

Путем химического синтеза были получены фоторасщепляемые направляющие сгРНК с одним или двумя фоточувствительными линкерами, содержащие 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды и LNA-нуклеотиды. В качестве линкерных были использованы остатки 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Предварительно нами было показано, что сгРНК, содержащие 2'-фтор-модифицированные и LNA-нуклеотиды, более устойчивы к действию нуклеаз сыворотки, чем немодифицированные сгРНК, а скорость расщепления ДНК нуклеазой Cas9 в их присутствии не критично отличается от немодифицированной сгРНК.

При сравнительном исследовании эффективности расщепления плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии фоторасщепляемых направляющих РНК была продемонстрирована возможность инактивации системы путем УФ-облучения. Наиболее успешно удалось инактивировать работу систем при использовании направляющих РНК с двумя фоторасщепляемыми линкерами.

На модельных синтетических ДНК-дуплексах с однонуклеотидными заменами показана более высокая специфичность расщепления целевой мишени системами CRISPR/Cas9 с фоторасщепляемыми направляющими сгРНК по сравнению с аналогичной системой, без фотолинкеров. Использование направляющих сгРНК с одним фотолинкером обеспечивало более высокую специфичность по сравнению с сгРНК с двумя фотолинкерами. При этом максимальную специфичность проявили системы с фоторасщепляемыми сгРНК, не модифицированными по остаткам рибозы.

Таким образом, предложенный вариант модифицированных сгРНК позволяет повысить устойчивость направляющих РНК к действию нуклеаз, сохранить высокую скорость и эффективность расщепления ДНК-мишени

нуклеазой Cas9, а также повысить специфичность действия и добавить возможность инактивации системы после облучения УФ-светом. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 22-14-00294.

## 2'-MODIFIED PHOTOCLEAVABLE GUIDE RNAs FOR CRISPR/Cas9 SYSTEM WITH IMPROVED FEATURES

L.V. Sakovina<sup>1,2\*</sup>, E.A. Akhmetova<sup>1</sup>,  
D.S. Novopashina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, Russia

\* e-mail: kodi@list.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9, guide RNAs, 2'-modified RNA, photoregulation, specificity, efficacy.

## ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ — НОКАУТОВ MARCHANTIA POLYMORPHA ПО ГЕНАМ TRFL И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ БЕЛКА TRFL6 В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР

А.В. Санникова<sup>1\*</sup>, М.Р. Шарипова<sup>1</sup>,  
Е.В. Шакиров<sup>1,2</sup>, Л.П. Валеева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

420008, Казань, Кремлевская, 18 1

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, College of Science  
25701, West Virginia, Huntington, Marshall University 2

\* e-mail: Anastasya.sannikova@bk.ru

**Ключевые слова:** теломеры, бриофиты, *Marchantia polymorpha*, CRISPR/Cas9.

Теломеры — важнейшие структуры на физических концах хромосом эукариот, участвующие в защите генетического материала клетки. Несмотря на разнообразие белковых компонентов теломерных комплексов среди представителей разных царств живых организмов, многие из них консервативны, что указывает на их эволюционно важную роль. Такими являются белки TRF (Telomere Repeat Factor), связывающие дцДНК, в частности, hTRF человека, мутации в генах которых летальны. У растений обнаружены гомологичные гены теломерных белков — TRFL (TRF-like). Так, у модельных растений *Arabidopsis thaliana* обнаружено 12 паралогов генов TRFL, функциональная роль которых до сих пор остается не изученной. Тем самым, для изучения эволюции регуляции биологии теломер и стабильности генома в растениях необходимо использование других модельных систем, характеризующихся избыточными геномами, в связи с чем перспективным объектом исследования является бриофит *Marchantia polymorpha*, занимающая критически важное эволюционное положение для детального изучения специфических молекулярных и клеточных процессов развития.

Целью работы является изучение роли TRFL белков в поддержании длины теломер и развитии растений *M. polymorpha*. В качестве диких типов растений в работе были использованы культуры печеночника *M. polymorpha* линии Takaragaik-1 (Tak-1, мужское растение) и Takaragaik-2 (Tak-2, женское растение). Биоинформационный анализ генома показал наличие трех генов-паралогов TRFL у *M. polymorpha* (TRB1, TBP,

*TRFL6*). Мутантные растения получали методом редактирования генома CRISPR/Cas9 с применением агробактериальной трансформации. Селекцию проводили на среде GB5 с двумя антибиотиками: хлорсульфуроном и гигромицином. Для анализа длины теломер использовали геномную ДНК, выделенную из таллома маршанции. Анализ длины теломер проводили методом TRF совместно с Саузерн-блот анализом.

Методом CRISPR/Cas9 редактирования генома были получены 10 растений-нокаутов по гену *TRFL6*, 3 растения-нокаута по гену *TBP* и 6 растений-двойных мутантов по генам *TRFL6* и *TRB1*. Для нокаутированных по гену *TRFL6* растений *M. polymorpha* было показано незначительное сокращение длины теломер по сравнению с диким типом. Помимо этого, у растений-нокаутов наблюдали дефекты роста ткани таллома.

Таким образом, мы получили 19 растений-нокаутов по теломерному белкам *M. polymorpha* и показали, что роль белка гомолога *TRFL6* является позитивным регулятором длины теломер в растении.

В дальнейшем нами будут изучены остальные полученные индивидуальные растения-нокауты по генам *TRB1*, *TBP*, а также растения с нокаутом по двум целевым генам. Установлена окончательная роль консервативных *TRFL* генов в регуляции длины теломер *M. polymorpha*, что позволит лучше понять эволюцию регуляторных путей поддержания структуры теломер в растениях и эукариот в целом. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 21-14-00147.

#### DEVELOPMENT OF MARCHANTIA POLYMORPHA KNOCKOUT PLANTS BY TRFL GENES AND DETERMINING THE ROLE OF TRFL6 PROTEIN IN TELOMERE LENGTH REGULATION

A.V. Sannikova<sup>1\*</sup>, M.R. Sharipova<sup>1</sup>,  
E.V. Shakirov<sup>1,2</sup>, L.R. Valeeva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Kazan Federal University  
420008, Kazan, Kremlevskaya, 18 1

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, College of Science  
25701, West Virginia, Huntington, Marshall University 2

\*e-mail: Anastasya.sannikova@bk.ru

**Keywords:** telomeres, bryophytes, *Marchantia polymorpha*, CRISPR/Cas9.

#### ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИЗ ОТДЕЛЬНЫХ СЛОЕВ СТЕНКИ ВЕНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОЙ ЗАХВАТЫВАЮЩЕЙ МИКРОДИССЕКЦИИ

М.А. Сметанина<sup>1,2\*</sup>, В.А. Короленя<sup>1,2</sup>,  
К.С. Севостьянова<sup>2,3</sup>, К.А. Гаврилов<sup>2,3</sup>,  
А.И. Шевела<sup>2,3</sup>, М.Л. Филипенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины (ИХБФМ) СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

<sup>3</sup> Центр новых медицинских технологий ИХБФМ  
СО РАН  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 25/4

\*e-mail: mariya\_smetanina@niboch.nsc.ru

**Ключевые слова:** слои венозной стенки, лазерная захватывающая микродиссекция, РНК, ДНК.

Стенка вены состоит из функциональных слоев, представленных определенным клеточным составом. Несмотря на то что анализ материала из цельных сегментов вен позволяет выявлять генетические и эпигенетические признаки патологического состояния, исследование венозной стенки послойно может внести больший вклад в понимание патогенеза. Одним из способов извлечения клеток из ткани является лазерная захватывающая микродиссекция (ЛЗМ), которую используют не только для таких органов как мозг, но и для органов с большим количеством плотного внеклеточного матрикса. Целью работы была оценка применимости ЛЗМ для исследования патологии вен.

Для сохранения исходного профиля экспрессии генов и метилирования ДНК образцы варикозно трансформированных вен сразу после операции помещали в жидкий азот и хранили при -70°C до момента обработки. Все рабочие поверхности обрабатывали от загрязнений и РНКаз. Замороженные сегменты вен фиксировали смолой Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc.) и помещали в замораживающий микротом CryoStar NX70 (Thermo Fisher Scientific UK, 2020). Были подобраны параметры температуры и толщины резки, при которых удалось получить срезы и выполнить вырезание и катапультирование фрагментов стенки вены. Срезы помещали на слайды для лазерной микродиссекции Carl Zeiss™ Membrane Slides NF 1.0 PEN и проводили дальнейшие процедуры пробоподготовки. Для ЛЗМ (предварительно был выполнен подбор условий для прорезания ткани лазером) использовали микроскоп Axio Zoom.V16, лазерный микродиссектор PALM MicroBeam и пробирки с адгезивными крышками AdhesiveCap (Zeiss, Германия).

Исходя из определения качественных и количественных характеристик выделенных нуклеиновых кислот с использованием различных приборов (Qubit® 4 Fluorometer, NanoDrop 2000, Agilent 2100 Bioanalyzer), мы сделали вывод о недостаточности количества и неприемлемости качества материала для проведения дальнейших исследований экспрессии генов и метилирования ДНК. Применение других методов разделения венозной стенки, таких как механических соскоб и разделение поперечного среза на слои иглами под увеличением, позволяет получить куда более значительное количество нуклеиновых кислот приемлемого качества. Действительно, при длительном вырезании лазером (ввиду очень плотного внеклеточного матрикса в варикозных венах) в условиях комнатной температуры и открытого воздуха добиться получения материала в количестве и качестве, достаточном для проведения анализа экспрессии генов и метилирования ДНК, очень сложно. Кроме того, данный метод не лишен недостатка контаминации вырезанных сегментов ткани обломками клеток, разлетающихся при вырезании лазером, от соседних слоев венозной стенки.

Таким образом, мы сделали вывод о неприменимости метода ЛЗМ к образцам варикозно трансформированных вен. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-25-00832.

### EVALUATION OF THE APPLICABILITY OF THE METHOD FOR OBTAINING BIOLOGICAL MATERIAL FROM SEPARATE LAYERS OF THE VEIN WALL USING LASER CAPTURE MICRODISSECTION

M.A. Smetanina<sup>1,2\*</sup>, V.A. Korolenya<sup>1,2</sup>,  
K.S. Sevostyanova<sup>2,3</sup>, K.A. Gavrilov<sup>2,3</sup>,  
A.I. Shevela<sup>2,3</sup>, M.L. Filipenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine (ICBFM) SB RAS

630090, Novosibirsk, 8 Lavrentiev Ave.

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

630090, Novosibirsk, 1 Pirogova Str.

<sup>3</sup> Center for New Medical Technologies ICBFM SB RAS

630090, Novosibirsk, 25/4 Pirogova Str.

\*e-mail: mariya\_smetanina@niboch.nsc.ru

**Keywords:** venous wall layers, laser capture microdissection, RNA, DNA.

### ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ ПЛЕЧ ГОМОЛОГИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТЕГРАЦИИ ДЛИННОГО ТРАНСГЕНА В ОБЛАСТЬ РАЗРЫВА, СОЗДАВАЕМОГО НУКЛЕАЗОЙ Cas9 ИЛИ Crpf1

Ю.А. Таран<sup>1\*</sup>, Р.Р. Минтаев<sup>1</sup>, Д.В. Глазкова<sup>1</sup>,  
Г.А. Шипулин<sup>1</sup>, Е.В. Богословская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Центр стратегического планирования  
и управления медико-биологическими рисками  
здоровью» Федерального медико-биологического  
агентства

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10 с1

\*e-mail: taran.julia01@gmail.com

**Ключевые слова:** ВИЧ, CRISPR/Cas, CCR5, гомологичная рекомбинация.

Нокаут в клетках гена рецептора CCR5, который является корецептором вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), достигаемый с помощью редактирования нуклеазами системы CRISPR/Cas, делает эти клетки устойчивыми к CCR5-тропному ВИЧ. Однако для защиты клеток от ВИЧ другой тропности необходимо использовать дополнительные подходы, один из которых — интеграция антивирусных генов, защищающих от заражения ВИЧ, в место двучепочечного разрыва, созданного нуклеазой в CCR5. Встраивания можно добиться за счет гомологичной рекомбинации (HDR), если в клетку ввести донорную ДНК с плечами, гомологичными последовательностям, прилегающим к области разрыва.

Чтобы оценить реализуемость такого подхода мы изучили встраивание гена *EGFP* в *CCR5* locus с использованием двух разных нуклеаз и различных вариантов донорной ДНК. Для целевого разрезания использовали нуклеазу Cas9 или нуклеазу Crpf1 с соответствующими направляющими РНК (gRNA) к гену *CCR5*, которые обеспечивали высокую эффективность нокаута (87,8% и 76,6% соответственно на клеточной линии HT1080). Донорная ДНК содержала экспрессионную кассету с геном *EGFP*, фланкированную плечами гомологии разной длины (1000, 800, 600 и 150 пар нуклеотидов). На концах плеч гомологии находились сайты разрезания одной из нуклеаз (последовательности gRNA-PAM). Для плеч длиной 1000 п.н. также были созданы конструкции без сайтов разрезания. Доставку донорной ДНК в клетки проводили с помощью вектора AAV. Клетки HT1080 электропорировали комплексом нуклеаза/gRNA

и затем трансдуцировали AAV. Через 3 недели определяли эффективность встраивания кассеты по проценту EGFP-положительных клеток с помощью проточной цитометрии.

Добавление сайтов разрезания в конструкцию с плечами 1000 п.н. увеличивало эффективность встраивания с  $50 \pm 3\%$  до  $60,9 \pm 0,5\%$  для Cas9 и не влияло на эффективность встраивания конструкции для Crpf1 ( $61,3 \pm 2,8\%$  vs  $64,4 \pm 1,5\%$ ). В отличие от литературных данных, мы не увидели зависимости между эффективностью интеграции и длиной плеч гомологии ни для Cas9, ни для Crpf1. Значительное падение эффективности с 66,4% до 48% наблюдалось только для Crpf1-нуклеазы при уменьшении плеч гомологии с 600 п.н. до 150 п.н. Отсутствие прямой зависимости между длиной плеч гомологии и эффективностью встраивания может быть связано с доставкой трансгена с помощью AAV-вектора, который обеспечивает более благоприятные условия для HDR. Несмотря на то что эффективность нокаута для Crpf1 была ниже, чем для Cas9, интеграция проходила более эффективно при использовании Crpf1, что может быть связано с тем, что Crpf1 разрезает ДНК с образованием липких концов, которые могут направлять репарацию по пути HDR. Максимальный процент встраивания (66,4%) был достигнут при использовании трансгена с плечами гомологии длиной 600 нуклеотидов и нуклеазы Crpf1. Разработанная система может быть в дальнейшем использована для интеграции анти-вирусных генов в locus *CCR5*.

### CRISPR-Cas-MEDIATED TARGETED INTEGRATION OF A LONG TRANSGENE USING Cas9 OR Cas12A NUCLEASE AND VARIOUS STRUCTURES OF HOMOLGY ARMS FLANKING THE TRANSGENE

I.A. Taran<sup>1\*</sup>, R.R. Mintaev<sup>1</sup>, D.V. Glazkova<sup>1</sup>,  
G.A. Shipulin<sup>1</sup>, E.V. Bogoslovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Center for Strategic  
Planning and Management of Medical and Biological  
Health Risks», Federal Medical-Biological Agency  
119121, Moscow, Pogodinskaya street, 10 с1

\*e-mail: taran.julia01@gmail.com

**Keywords:** HIV, CRISPR/Cas, CCR5, HDR.

### СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИЙ ГЕНА *UBE2A* НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

А.В. Федоренко<sup>1,3\*</sup>, Е.А. Хомякова<sup>1</sup>,  
А.В. Сурдина<sup>1</sup>, Е.А. Воловиков<sup>1,2,4</sup>,  
Е.К. Секретова<sup>1,4</sup>, Л.Д. Беликова<sup>1,2,4</sup>,  
А.Н. Богомазова<sup>1,2</sup>, М.А. Лагарькова<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ  
им. Лопухина ФМБА

119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

<sup>2</sup> Томский национальный исследовательский  
медицинский центр РАН

634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10

<sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий

121205, Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1

<sup>4</sup> Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

\*e-mail: afedorenko00@mail.ru



**Ключевые слова:** ген *UBE2A*, X-сцепленная умственная отсталость, синдром Насименто, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR-Cas9.

Синдром X-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто был впервые описан в 2006 году [1]. Для синдрома Насименто характерны задержка психического развития, черепно-лицевые дисморфии, нарушение интеллекта и др. Развитие данного синдрома связывают с дисфункциональностью гена *UBE2A* [1], также существуют предварительные данные, что избыточная доза гена *UBE2A* может тоже обладать нейротоксичностью. Ген *UBE2A* кодирует убиквитин-связывающий белок E2, участвующий в процессе убиквитинирования белков. Роль гена *UBE2A* в нормальном развитии мозга и молекулярные механизмы, лежащие в основе синдрома Насименто, до сих пор остаются малоизученными.

С целью изучения роли гена *UBE2A* в нейрогенезе была создана изогенная клеточная модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые способны к самоподдержанию и дифференцировке в различные типы клеток, включая нейрональные клетки. Кроме того, ИПСК предоставляют возможность формирования трехмерных (3D) клеточных структур, органоидов, специфичных для определенных органов, включая мозг. Таким образом, использование ИПСК позволяет изучать процессы раннего нейронального развития.

Мы получили клеточные линии ИПСК, нокаутные по *UBE2A*, из ИПСК здоровых доноров с использованием технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для дальнейшей работы были отобраны два мужских клона с гемизиготным нокаутом гена и один женский клон с гомозиготным нокаутом. Отсутствие функционального белка в ИПСК было подтверждено Вестерн-блоттингом. Для изучения эффекта повышенной экспрессии *UBE2A* в геном женской и мужской линий ИПСК были встроены дополнительные копии этого гена. Индуцибельная сверхэкспрессия *UBE2A* была подтверждена с помощью количественной ОТ-ПЦР и Вестерн-блоттингом. Отредактированные линии ИПСК сохранили плюрипотентные свойства, и генетические манипуляции не вызвали аномалий кариотипа.

На данный момент полученные линии ИПСК с различным статусом *UBE2A* проходят процесс дифференцировки в нейрональном направлении для проведения морфометрического анализа отростков нейронов. Это позволит изучить роль гена *UBE2A* на начальных стадиях нейрогенеза. Результаты морфометрического анализа будут представлены на конференции. Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 21-65-00017.

#### Литература

1. Nascimento RMP et al. *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;79(3):549–555.

## DEVELOPMENT OF AN ISOGENIC CELL MODEL TO INVESTIGATE *UBE2A* GENE FUNCTIONS USING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

A.V. Fedorenko<sup>1,3\*</sup>, E.A. Khomyakova<sup>1</sup>,  
A.V. Surdina<sup>1</sup>, E.A. Volovikov<sup>1,2,4</sup>,  
E.K. Sekretova<sup>1,4</sup>, L.D. Belikova<sup>1,2,4</sup>,  
A.N. Bogomazova<sup>1,2</sup>, M.A. Lagarkova<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, Lopukhin Federal Research Clinical Center of Physical and Chemical Medicine

119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a

<sup>2</sup> Department of Ontogenetics, Tomsk National Research Medical Center

634050, Tomsk, Embankment of the Ushayki river, 10

<sup>3</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology

121205, Moscow, Bolshoy Boulevard 30, bld. 1

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University

119991, Moscow, Leninskie Gory, 1

\*e-mail: afedorenko00@mail.ru

**Keywords:** *UBE2A* gene, X-linked retardation syndrome, Nascimento type, induced pluripotent stem cells, CRISPR-Cas9.

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *GAUT ARABIDOPSIS THALIANA* И СНИЖЕНИЕ АГРЕГАТИВНОСТИ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

Т.А. Франкевич, Н.В. Пермьякова\*,  
Ю.В. Сидорчук, Е.В. Дейнеко

Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10

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

**Ключевые слова:** пектин, редактирование генов, *Arabidopsis thaliana*, рекомбинантные белки, суспензионные культуры клеток.

В настоящее время основную часть биофармацевтических белков получают не из природных источников, а синтезируют их аналоги в различных системах экспрессии, таких как *E. coli*, дрожжи, культуры клеток млекопитающих и растений. Синтез рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии, в частности в суспензионных культурах клеток высших растений, сочетает возможность посттрансляционных модификаций по эукариотическому типу, простоту и рентабельность. Клетки растений как системы наработки биофармацевтических белков, тем не менее, имеют ряд недостатков, один из которых связан с недостаточно высоким выходом рекомбинантного белка. Причиной этого может являться склонность клеток в суспензии образовывать агрегаты. На сегодняшний день существует ряд методов снижения размеров агрегатов в суспензиях, включая химические и механические способы, но ни один из них не является оптимальным и универсальным. Поэтому поиск новых способов снижения агрегативности суспензий является актуальной задачей.

В ряде экспериментов было показано, что снижение агрегативности некоторых растительных суспензионных клеточных культур приводит к повышению выхода вторичных метаболитов. Предполагается, что такой же эффект может проявляться и в отношении рекомбинантных белков.

Межклеточная адгезия, характерная для растений, может являться основной причиной агрегативности растительных клеточных суспензий. Известно, что большую роль в поддержании контактов между клетками играют

пектины клеточных стенок. Мутантные растения по одному из генов семейства GAUT, *GAUT8/Qua1-1*, характеризуются сниженной адгезией в вегетативных органах. Мы полагаем, что суспензионные клеточные культуры с нокаутом генов, ответственных за синтез пектинов, в сравнении с культурами дикого типа будут образовывать агрегаты меньших размеров.

За полимеризацию одного из важнейших пектинов клеточной стенки, гомолактуронана, у *Arabidopsis thaliana* отвечает ферментативный комплекс GAUT1:GAUT7. Мы предполагаем получить при помощи системы CRISPR/Cas9 нокауты двух генов, отвечающих за синтез данных ферментов (*GAUT1* и *GAUT7*), в культуре суспензионных клеток, несущих ген *gfp*. Таким образом, мы сможем исследовать влияние нокаута этих генов на агрегативность клеток в суспензионной культуре и на уровень продукции рекомбинантного белка GFP.

Нами была проведена биобаллистическая трансформация каллусных культур. Обнаружены события геномного редактирования обоих генов. Эффективность редактирования оказалась недостаточно высокой и составила от 0.2% до 0.8%. Поэтому было принято решение провести редактирование при помощи агробактериальной трансформации целых растений, из которых затем будет индуцирована каллусная культура. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, грант № FWNR-2022-0022.

#### GENE EDITING OF THE GAUT FAMILY GENES OF ARABIDOPSIS THALIANA AND DECREASE IN CELL AGGREGATIVITY IN SUSPENSION CULTURE

T.A. Frankevich, N.V. Permyakova\*,  
Yu.V. Sidorchuk, E.V. Deineko

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 10

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

**Keywords:** pectin, gene editing, *Arabidopsis thaliana*, recombinant proteins, cell suspension cultures.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ПРИ ТРАВМАХ СПИННОГО МОЗГА

Г.А. Фурса<sup>1,2,5\*</sup>, С.С. Андреева<sup>1,4</sup>,  
О.В. Степанова<sup>1,5</sup>, А.В. Чадин<sup>1</sup>, А.С. Семкина<sup>1,2</sup>,  
Е.К. Карсунцева<sup>1</sup>, А.Д. Воронова<sup>1,5</sup>,  
В.С. Шишкина<sup>1</sup>, И.В. Решетов<sup>3,6</sup>, В.П. Чехонин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава  
России

119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ

119997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

<sup>3</sup> УКБ № 1 ФГАОУ ВО Первого МГМУ им.

И.М. Сеченова МЗ РФ

119435, Москва, ул. Большая Пироговская, б. ст. 1

<sup>4</sup> Московский государственный университет им.

М.В. Ломоносова

119234, Москва, Ленинские горы, д. 1

<sup>5</sup> ФГБУ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова  
МЗ РФ

121522, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

<sup>6</sup> АПО ФГБУ ФНКЦ ФМБА

125371, Москва, Волоколамское ш., д. 91

\*e-mail: Gregorii.fursa@gmail.com

**Ключевые слова:** нейротрофический фактор мозга; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; травма спинного мозга; клеточная терапия; регенеративная медицина.

Лечение травм спинного мозга — актуальная проблема современной медицины. Важную роль в терапии играют нейротрофические факторы. В ряде работ был показан вклад нейротрофического фактора мозга (BDNF) в восстановление функций спинного мозга [1]. Наиболее простым способом доставки нейротрофина является прямое введение в зону травмы. Однако данный метод сопряжен с такими проблемами, как низкая диффузия в ткани и быстрая деградация факторов. Более перспективным является трансплантация трансдуцированных клеток, экспрессирующих нейротрофин длительное время. Целью данной работы является оценка эффективности применения трансдуцированных клеток обонятельной выстилки при травмах спинного мозга.

Обкладочные клетки из обонятельной выстилки человека были получены по разработанному нами протоколу [2]. Для получения генно-клеточных препаратов обкладочные клетки трансдуцировали аденовекторами с трансгенами зрелой формы нейротрофического фактора мозга (mBDNF) и люциферазой светлячка (Fluc) в качестве контроля. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после травмы. 750 тысяч и 1.5 миллиона клеток через 4 недели после травмы были трансплантированы в кисту или область травмы без кисты в 10 мкл среды DMEM/F12(1:1). Терапевтическая эффективность препаратов была оценена по улучшению двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель с помощью ВВВ-тестов.

Трансплантация 1.5 миллиона трансдуцированных клеток, экспрессирующих mBDNF, в кисту более эффективна, чем введение 750 тысяч трансдуцированных клеток. При трансплантации в зону спинного мозга без кисты оптимальным оказался препарат из 750 тысяч трансдуцированных клеток. Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с тем, что капсула кисты создает физический барьер, затрудняет развитие иммунного ответа и может таким образом улучшать выживаемость клеток и повышать эффективность трансплантации.

Особенности патологических процессов при хроническом повреждении спинного мозга могут оказывать влияние на эффективность трансплантируемых препаратов. Примененные нами препараты сделаны на основе обкладочных клеток человека, которые в дальнейшем могут быть использованы для персонализированного подхода к лечению пациентов с травмами спинного мозга. Работа выполнена при поддержке государственного задания № 123022000056-7.

#### Литература

1. Sieck GC, Gransee MH, Zhan W, Mantilla CB. Acute intrathecal BDNF enhances functional recovery after cervical spinal cord injury in rats. *Journal of Neurophysiology*. 2021;125(6):2158–2165.
2. Stepanova OV, Voronova AD, Chadin AV et al. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs. *Stem Cells and Development*. 2019;28(18):1253–1263.

## APPLICATION OF TRANSDUCED CELLS OF THE OLFACTORY MUCOSA IN SPINAL CORD INJURIES

G.A. Fursa<sup>1,2,5\*</sup>, S.S. Andretsova<sup>1,4</sup>,  
O.V. Stepanova<sup>1,5</sup>, A.V. Chadin<sup>1</sup>, A.S. Semkina<sup>1,2</sup>,  
E.K. Karsuntseva<sup>1</sup>, A.D. Voronova<sup>1,5</sup>, V.S. Shishkina<sup>1</sup>,  
I.V. Reshetov<sup>3,6</sup>, V.P. Chekhonin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry

119034, Moscow, 23, Kropotkinsky lane

<sup>2</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University

119435, Moscow, 1, Ostrovityanova Street

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

119435, Moscow, 6-1, Bolshaya Pirogovskaya Str.

<sup>4</sup> Moscow State University

119234, Moscow, 1-12, Leninskie Gory

<sup>5</sup> National Medical Research Center of Cardiology

121522, Moscow, 15a, Academician Chazov Str.

<sup>6</sup> Academy of Postgraduate Education under FSBU FSCC of FMBA of Russia

125371, Moscow, 91, Volokolamskoe Hwy

\*e-mail: Gregorii.fursa@gmail.com

**Keywords:** brain-derived neurotrophic factor; ensheathing cells; olfactory mucosa; spinal cord injury; cell therapy; regenerative medicine.

## РОЛЬ PPAR-а В ПОДДЕРЖАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА КАРДИОМИОЦИТОВ

Г.А. Фурса<sup>1\*</sup>, А.Д. Воронова<sup>1</sup>,  
О.В. Степанова<sup>1</sup>, Т.В. Кузнецова<sup>1</sup>,  
Р.А. Полтавцева<sup>2</sup>, А.В. Тарасов<sup>1</sup>,  
А.Н. Самко<sup>1</sup>, С.Н. Терещенко<sup>1</sup>, В.П. Масенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России

121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15А, стр. 1

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

\*e-mail: gregorii.fursa@gmail.com

**Ключевые слова:** PPAR-а, кардиальный энергетический метаболизм, TNF-а, культивируемые кардиомициты человека, сердечная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия.

Рецептор, активируемый пролифератором пероксисом альфа (PPAR-а), является главным регулятором кардиального энергетического метаболизма [1]. В зрелых кардиомиоцитах PPAR-а экспрессируется на высоком уровне и регулирует процессы окисления и синтеза жирных кислот (ЖК) [2]. Еще одной важной функцией PPAR-а является участие в процессах воспаления. В экспериментах *in vitro* на кардиомиоцитах человека и грызунов было показано, что активированный лигандами PPAR-а подавляет воспалительные процессы, индуцированные провоспалительным цитокином фактором некроза опухоли альфа (TNF-а) [2]. Однако участие PPAR-а при развитии сердечной недостаточности (СН) остается мало изученным. Одной из основных причин СН является дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), при которой наблюдаются воспалительные процессы. Целью данной работы было оценить роль PPAR-а в поддержании метаболического статуса в кардиомиоцитах.

С помощью метода ПЦР в реальном времени нами были изучены уровни экспрессии PPAR-а, его генов-мишеней CD36, LCAD и CPT-1 на культуре фетальных кардиомиоцитов человека PPAR-а через 2, 24 и 48 часов после обработки TNF-а. Культура фетальных кардиомиоцитов была получена из плодов 8–9 недели гестации. Также уровни экспрессии PPAR-а, CD36, LCAD и CPT-1 были изучены в сердце человека без сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и в эндокардиальных биоптатах больных ДКМП с СН.

На культуре фетальных кардиомиоцитов человека было показано снижение уровня экспрессии PPAR-а и изменение экспрессии генов-мишеней через 2 и 24 часа после обработки TNF-а, что может говорить о переходе кардиального энергетического метаболизма от окисления ЖК к гликолизу. Через 48 часов было выявлено увеличение уровня экспрессии PPAR-а и изменения в уровнях экспрессии CD36, LCAD и CPT-1. Повышение уровня экспрессии PPAR-а, по-видимому, связано с обратным переходом от гликолиза к окислению ЖК, а также с увеличением его противовоспалительной активности при длительном воздействии провоспалительных цитокинов. Также было показано, что в сердце больных ДКМП с СН происходит значительное увеличение экспрессии PPAR-а по сравнению с сердцем человека без ССЗ, а также были выявлены изменения уровней экспрессии CD36, LCAD и CPT-1.

На культивируемых фетальных кардиомиоцитах человека и в сердце больных ДКМП с СН была показана роль PPAR-а в поддержании метаболического статуса в кардиомиоцитах и его протекторная роль при воспалительных процессах. Комбинация провоспалительной терапии и применение лекарственных лигандов PPAR-а возможно будет повышать его протекторную функцию в миокарде и способность регулировать метаболизм ЖК.

### Литература

1. Lockyer P et al. Minireview: Won't get fooled again: the nonmetabolic roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the heart. *Mol Endocrinol.* 2010;24(6):1111–1119.
2. Kim IS et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-targeted therapies: challenges upon infectious diseases. *Cells.* 2023;12(4):650.

## THE ROLE OF PPAR-а IN MAINTAINING THE METABOLIC STATUS OF CARDIOMYOCYTES

G.A. Fursa<sup>1\*</sup>, A.D. Voronova<sup>1</sup>, O.V. Stepanova<sup>1</sup>,  
T.V. Kuznetsova<sup>1</sup>, R.A. Poltavtseva<sup>2</sup>, A.V. Tarasov<sup>1</sup>,  
A.N. Samko<sup>1</sup>, S.N. Tereshchenko<sup>1</sup>, V.P. Masenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation

121552, Moscow, Academician Chazov street, 15A, building 1

<sup>2</sup> Federal State Budget Institution «National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov»

117997, Moscow, st. Academician Oparina, 4

\*e-mail: gregorii.fursa@gmail.com

**Keywords:** PPAR-а, cardiac energy metabolism, TNF-а, cultured human cardiomyocytes, heart failure, dilated cardiomyopathy.

## КИНЕТИКА БЕЛКА Cas12a И ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ

М.В. Фурсов\*, Е.И. Асташкин, И.А. Дятлов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии  
142279, Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов,  
Московская область

\*e-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

**Ключевые слова:** CRISPR; Cas12a; гены карбапенемаз; ферментативная кинетика; детекция.

CRISPR-Cas системы широко используются в разных областях биологии и медицины. В последние годы активно развивается направление CRISPR-диагностики [1]. Эти методы основаны на использовании белков Cas12 или Cas13 для детекции молекул ДНК или РНК, соответственно [2]. Преимуществом этих ферментов является наличие у них двух типов активности: cis и trans. В данной работе использован метод на основе детекции trans-активности фермента Cas12a для выявления эпидемически значимых генов карбапенемаз, обеспечивающих резистентность возбудителей внутрибольничных инфекций к современным β-лактамам антибиотикам широкого спектра. Целью работы было изучение кинетических характеристик фермента Cas12a, которые определяют пределы чувствительности и скорость реакции.

В качестве дцДНК-мишени (dsDNA) использовали ПЦР-продукт амплификации гена *bla*<sub>KPC-2</sub>, кодирующего карбапенемазу в штамме *Klebsiella pneumoniae* B-8912 (ГКПМ-Оболенск). Последовательность гидовой РНК (gRNA), комплементарной участку гена *bla*<sub>KPC-2</sub>, рассчитана с помощью веб-ресурса CHOP-CHOP, синтезирована в Синтол (Москва). Формировали рибонуклеопротеин (RNP): 400 нМ белка Cas12a и 500 нМ гидовой РНК инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. Для активации RNP (aRNP) вносили 800 нМ dsDNA и инкубировали в тех же условиях. Trans-активность aRNP инициировали внесением оцДНК-репортера (ssDNA), фланкированного флюорофором FAM и гасителем BHQ (Евроген, Москва), и детектировали флюоресценцию в трех повторностях на приборе CFX-96 (BioRad, США). Стандартные калибровочные кривые были построены по константным значениям флюоресценции после инкубирования aRNP с ssDNA (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 и 2000 нМ) в течение 10 ч при температуре 37 °С. В контроль вносили RNP или H<sub>2</sub>O. Кинетические свойства aRNP рассчитывали на основании результатов взаимодействия 5 нМ aRNP с ssDNA (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 и 2000 нМ) в течение 10 мин с интервалом учета флюоресценции 10 с при температуре 37 °С.

Экспериментально определены значения константы Михаэлиса (413,51 ± 267,49 нМ), каталитической константы (0,35294 ± 0,1813 с<sup>-1</sup>) и оборотного числа aRNP (1,937 ± 0,441 нМ/с). Чувствительность комплекса составила 0,5 нМ дцДНК-мишени, специфичность 100%. Описанный ферментный комплекс будет использован для разработки тест-системы детекции генов антибиотикорезистентности, эпидемически значимых для Российской Федерации. Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2019-1671).

### Литература

- Fozouni P, Son S, Diaz de León Derby M et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*. 2021;184(2):323–333.

- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018;360(6387):439–444.

## Cas12a ENZYME KINETICS AND CARBAPENEMASE GENE DETECTION

M.V Fursov\*, E.I. Astashkin, I.A. Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
142279, Territory "Kvartal A", 24, Obolensk, Serpukhov, Moscow region

\*e-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

**Keywords:** CRISPR; Cas12a; carbapenemase genes; enzymatic kinetics; detection.

## ЭКСПАНСИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ СО СНИЖЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ФИБРИНОГЕНА

А.П. Цыбденова<sup>1, 2\*</sup>, А.С. Долодоев<sup>1, 2</sup>,  
Л.Н. Токтохоева<sup>1</sup>, Е.С. Демина<sup>1</sup>, Н.П. Рабданова<sup>1</sup>,  
А.В. Ильина<sup>1</sup>, Ю.С. Балханов<sup>2, 3</sup>,  
А.А. Нимаева<sup>3</sup>, М.Ф. Серых<sup>3</sup>, Е.Ж. Мункоева<sup>4</sup>,  
Г.П. Носкова<sup>4</sup>, М.Н. Бутуханова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова

670000, Республика Бурятия, Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а

<sup>2</sup> ООО «МИП «Байкальский центр биотехнологий»

670034, Республика Бурятия, Улан-Удэ, ул. Хахалова, 12а

<sup>3</sup> ООО «Шэнэскин»

670034, Республика Бурятия, Улан-Удэ, ул. Хахалова, 12а

<sup>4</sup> Бурятская республиканская станция переливания крови МЗ РБ

670047, Республика Бурятия, Улан-Удэ, ул. Пирогова, 7а

\*e-mail: tsybdenova.aryuna@mail.ru

**Ключевые слова:** лизат тромбоцитов, экспансия, мезенхимальные стромальные клетки, вартонов студень.

Применение лизата тромбоцитов в связи с поиском оптимального состава сред для культивирования клеток, не содержащих ксеногенов и предназначенных для клинических и лабораторных протоколов, представляется актуальным [1]. Целью работы являлась оценка морфофизиологических особенностей и пролиферативной активности мезенхимальных стромальных клеток из вартонова студня пупочного канатика человека, культивируемых в среде с содержанием лизата тромбоцитов с редуцированным объемом фибриногена.

Выделение мезенхимальных стромальных клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным способом с помощью коллагеназы I типа и эксплантами в среде DMEM/F12 с 5% лизата тромбоцитов. Лизат тромбоцитов получали из лейкоредуцированного пулированного концентрата тромбоцитов. После криодеструкции (-20 °С) образцы с тромбоцитами центрифугировали (3000 об./минуту, 15 минут), фильтровали и добавляли в бессывороточную среду с антибиотиками. Анализ экспансии, выхода из разморозки после криоконсервации и длительность пассажей мезенхимальных стромальных клеток

пупочного канатика проводили в среде с 5% лизата тромбоцитов в сравнении с клетками, культивированными в среде с 10% фетальной телячьей сывороткой.

Установлено, что выделенные культуры клеток экспрессируют следующие поверхностные маркеры: CD73, CD90, CD105, CD44, CD29 — и характеризуются отсутствием на поверхности: CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, CD19. Показано, что при внесении 5% лизата тромбоцитов в питательную среду клоногенные, веретинovidные с отростками клетки сохраняли пролиферативную активность после заморозки/разморозки в течение 6 пассажей и были идентичны с культурами, которые вели в среде с фетальной телячьей сывороткой. Показано, что внесение тромболизата со сниженной концентрацией фибриногена в специализированную питательную среду обеспечивает получение качественного клеточного трансплантата в те же сроки, что и при культивировании с эмбриональной телячьей сывороткой. Полученные данные позволяют рекомендовать использование лизата тромбоцитов в качестве альтернативы ксеногенной сыворотки в протоколах *in vitro*.

#### Литература

1. Pittenger MF, Discher DE, Peault BM et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med.* 2019;4:22. doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.

### EXPANSION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM HUMAN UMBILICAL CORD WHARTON'S JELLY USING PLATELET LYSATE WITH REDUCED FIBRINOGEN CONCENTRATION

A.P. Tsybdenova<sup>1,2\*</sup>, A.S. Dolodoev<sup>1,2</sup>,  
L.N. Toktokhoeva<sup>1</sup>, E.S. Demina<sup>1</sup>,  
N.P. Rabdanova<sup>1</sup>, A.V. Ilyina<sup>1</sup>, Y.S. Balkhanov<sup>2,3</sup>,  
A.A. Nimaeva<sup>3</sup>, M.F. Serykh<sup>3</sup>, E.Z. Munkoeva<sup>4</sup>,  
G.P. Noskova<sup>4</sup>, M.N. Butukhanova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Banzarov Buryat State University  
670000, Republic of Buryatia, Ulan-Ude, st. Smolin, 24a

<sup>2</sup> LLC Baikal Biotechnology Center  
670034, Republic of Buryatia, Ulan-Ude, st. Khakhalov, 12a

<sup>3</sup> Sheneskin LLC  
670034, Republic of Buryatia, Ulan-Ude, st. Khakhalov, 12a

<sup>4</sup> Blood Transfusion Station of the Ministry of Health  
of the Republic of Buryat  
670047, Republic of Buryatia, Ulan-Ude, st. Pirogov, 7a

\*e-mail: tsybdenova.aryuna@mail.ru

**Keywords:** platelet lysate, expansion, mesenchymal stromal cells, Wharton's jelly.

### ВЛИЯНИЕ YAP И TAZ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА

О.Л. Черкашина<sup>1\*</sup>, А.Д. Смыслов<sup>1</sup>, Е.А. Бутова<sup>1</sup>,  
Э.Б. Дашинимаев<sup>2</sup>, Д.С. Аболин<sup>1</sup>, О.С. Роговая<sup>1</sup>,  
Е.А. Воротеяк<sup>1</sup>, Е.П. Калабушева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова  
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

\*e-mail: olgalcher@gmail.com

**Ключевые слова:** YAP-сигналинг, регенерация кожи, эпидермис, ингибирование пути YAP.

YAP и TAZ регулируют процессы, связанные с регенерацией кожи. Чтобы проанализировать, какие изменения ассоциированы с сигнальным путем YAP, гены YAP и TAZ нокаутировали в кератиноцитах линии HaCaT при помощи системы CRISPR/Cas9. Поскольку клетки с полным нокаутом YAP оказались нежизнеспособны, использовали клетки с гетерозиготным нокаутом YAP (Control, dTAZ<sup>-/-</sup>, dYAP<sup>+/-</sup>). Поскольку эффект ингибирования YAP или TAZ может компенсироваться активностью паралога, в клетки с нокаутом были дополнительно введены конструкции, экспрессирующие shRNA, нацеленные на YAP (shYAP) или TAZ (shTAZ) в сравнении с контролем (shScramble). Эффективность нокаута и нокадауна подтвердили при помощи количественной ПЦР и вестерн-блота.

Мы ранее показали, что при активации пути YAP замедляется дифференцировка кератиноцитов. Ингибирование YAP в клетках HaCaT позволило отследить связь изменений в пролиферации и дифференцировке клеток с изменениями в активности YAP.

Скорость пролиферации как клеток dYAP<sup>+/-</sup>, так и shYAP, была заметно снижена, экспрессия маркеров дифференцированных слоев эпидермиса повышалась. У dTAZ<sup>-/-</sup> изменения были менее выражены. При этом одновременное ингибирование YAP и TAZ (dTAZ<sup>-/-</sup> shYAP и dYAP<sup>+/-</sup> shTAZ) не приводило к значительному изменению фенотипа. У клеток dYAP<sup>+/-</sup> shYAP скорость пролиферации значительно снижалась, однако содержание ряда маркеров дифференцировки было ниже, чем в случае dYAP<sup>+/-</sup>.

Таким образом, YAP/TAZ могут оказывать дозозависимый эффект на дифференцировку клеток. Кроме того, несмотря на их совместное участие в сигнальном пути, каждый паралог по-разному воздействует на процессы, связанные с регенерацией, и можно предположить, что основную роль выполняет YAP, а TAZ опосредует вспомогательные эффекты. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-30015.

### THE INFLUENCE OF YAP AND TAZ ON THE PROCESSES OF REGENERATION OF THE HUMAN EPIDERMIS

O.L. Cherkashina<sup>1\*</sup>, A.D. Smyslov<sup>1</sup>, E.A. Butova<sup>1</sup>,  
E.B. Dashinimaev<sup>2</sup>, D.S. Abolin<sup>1</sup>, O.S. Rogovaya<sup>1</sup>,  
E.A. Vorotelyak<sup>1</sup>, E.P. Kalabusheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian  
Academy of Sciences  
119334, Moscow, 26 Vavilov Street

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University  
117997, Moscow, 1 Ostrovityanova Street

\*e-mail: olgalcher@gmail.com

**Keywords:** YAP signaling, skin regeneration, epidermis, YAP inhibition.

### GluN3A — ОДИН НОКАУТ, МНОЖЕСТВО ВОЗМОЖНОСТЕЙ

А.В. Чиринскайте<sup>1\*</sup>, Ю.В. Сопова<sup>1</sup>,  
П. Устабаев<sup>1</sup>, Леонова Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9

\*e-mail: ChirinskaiteA@yandex.ru

**Ключевые слова:** Cas9, Болезнь Альцгеймера, GluN3A, NMDA-рецепторы, животные модели заболеваний человека.

Создание адекватных моделей для мультифакторных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, является сложной задачей. У человека болезнь Альцгеймера сопровождается рядом отличительных признаков, например, агрегацией амилоидного пептида бета, накоплением гиперфосфорилированного тау-белка, а также когнитивными нарушениями. В качестве моделей развития данного заболевания зачастую используют линии трансгенных мышей 5xFAD или 3xTg. Для первой линии мышей характерна высокая скорость развития и тяжелое протекание заболевания без образования нейрофибриллярных клубков. Вторая линия характеризуется более медленным течением заболевания с формированием нейрофибриллярных клубков. Обе линии несут ряд мутаций, характерных для наследственных форм болезни Альцгеймера, что не позволяет считать их адекватными моделями развития спорадической формы данного заболевания. Альтернативой данным моделям может стать мышечная модель с нокаутом гена *Grin3A*, кодирующего белок GluN3A — субъединицу NMDA-рецепторов. Нокаут данного гена приводит к повышению уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , что у стареющих мышей вызывает нейровоспаление, нарушения памяти, накопление гиперфосфорилированного тау-белка и развитие амилоидных бляшек [1]. Также у нокаутных по гену *Grin3A* мышей были описаны нарушения социального поведения и снижение экспрессии генов окситоциновых рецепторов, что может приводить к депрессивным расстройствам [2]. Было показано, что инактивация NMDA-рецепторов в печени приводит к повышению уровня глюкозы в крови, таким образом оказывая влияние на развитие диабета и ожирения [3]. В нашей лаборатории с помощью нуклеазы Cas9 была получена линия мышей, нокаутных по гену *Grin3A*, которые в возрасте 6 месяцев уже демонстрируют когнитивные нарушения, а также имеют лишний вес. Учитывая плейотропность действия данного гена, данные мыши могут быть широко использованы в исследованиях человеческих заболеваний. Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 94030690.

#### Литература

- Zhong W, Wu A, Berglund K et al. Pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease by deficiency of NMDA receptor subunit GluN3A. *Alzheimers Dement.* 2022;18(2):222–239. doi: 10.1002/alz.12398.
- Lee JH, Zhang JY, Wei ZZ, Yu SP. Impaired social behaviors and minimized oxytocin signaling of the adult mice deficient in the N-methyl-D-aspartate receptor GluN3A subunit. *Exp Neurol.* 2018;305:1–12. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.02.015.
- Lam CK, Chari M, Su BB et al. Activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the dorsal vagal complex lowers glucose production. *J Biol Chem.* 2010;16:285(29):21913–21921. doi: 10.1074/jbc.M109.087338.

### GluN3A — ONE KNOCKOUT BUT MANY OPPORTUNITIES

A.V. Chirinskaite<sup>1\*</sup>, J.V. Sopova<sup>1</sup>,  
P. Ustabaev<sup>1</sup>, E.I. Leonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State University  
199034, Saint-Petersburg, 7-9 Universitetskaya Emb.

\*e-mail: ChirinskaiteA@yandex.ru

**Keywords:** Cas9, Alzheimer's disease, GluN3A, NMDA receptors, Animal models for human disease.

### ПОЛУЧЕНИЕ МЫШЕЙ С АДРЕСНЫМИ МАШТАБНЫМИ ПЕРЕСТРОЙКАМИ В ПРИЦЕНТРОМЕРНОМ РАЙОНЕ ХРОМОСОМЫ 1

Э.А. Чуйко<sup>1,2\*</sup>, А. Нурисламов<sup>2,3</sup>,  
И.А. Серова<sup>1,2</sup>, О.Л. Серов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН  
634050, Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, НГУ  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1

\*e-mail: eduardchuyko@yandex.ru

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, chromosomal engineering, megabase scale deletion, microinjection, reparation, mouse, C57BL/6J.

Хромосомные перестройки и изменение числа копий генов представляют собой распространенную причину наследственных заболеваний. Согласно ранее проведенным исследованиям, изменение числа копий гена *CNTN6* может вызывать разные фенотипические проявления у носителей, обозначаемые как пенетрантность [1]. В работе мы использовали CRISPR/Cas9 систему для создания мышей-носителей адресных делеций около мегабазного масштаба (930698 пар оснований) в прицентромерном районе хромосомы 1, включающий ген *Xkr4* (XK Related 4), участвующий в экспозиции фосфатидилсерина на поверхность апоптических клеток, с целью исследования их фенотипических проявлений.

При создании мышей с адресной модификацией генома мы проводили микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 в зиготы мышей с использованием двух направляющих РНК (sgRNA). В результате внесения ДЦР ожидалось получить делеции и, как нередко случается в подобных опытах, появление инверсий и дупликаций.

В ходе эксперимента было проведено микроинъекций в 539 зигот, из которых 462 (86%) выжили и поделались 1 раз *in vitro*. 406 эмбрионов были трансплантированы суррогатным матерям, в результате родилось 46 мышей. Из них 4 мыши несли делецию гена *Xkr4*, 6 — инверсии, а 1 мышь — дупликацию, в итоге, 11 мышей из 46 обнаружили с какой-либо формой перестройки. Интересно отметить, что две мыши несли одновременно делецию, инверсию и аллель дикого типа, а их потомки без перестроек встречались в примерно одном случае из 10, перестройки наследовались независимо друг от друга, что говорит об их мозаицизме. Также мы заметили очень интересные события репарации у животных при возникновении инверсий, а именно: в двух случаях мы наблюдали как из инвертированного участка ДНК выпало около одной нуклеосомы и встроилась независимо от основной перестройки непосредственно рядом с местами посадки sgRNA, что ранее описано не было и является уникальным, а также в двух случаях идеальную репарацию правой стороны инверсии. Механизм же идеальной репарации в одном из концов можно объяснить пролонгированным экранированием именно тех концов, которые идеально репарировались ввиду отложенной диссоциации комплекса Cas9:РНК:ДНК с ДНК [2].

Таким образом, полученные результаты показывают, что примененный метод CRISPR/Cas9 адресной

модификации генома мыши, включающей делецию свыше 900 т.п.о. в прицентромерном районе хромосомы 1 мыши, оказался эффективным. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017; <https://rscf.ru/project/21-65-00017>.

#### Литература

- Huang AY et al. Rare copy number variants in NRXN1 and CNTN6 increase risk for Tourette syndrome. *Neuron*. 2017;94(6):1101–1111.e7. doi: 10.1016/J.NEURON.2017.06.010.
- Zhang Q et al. The post-PAM interaction of RNA-guided sp-Cas9 with DNA dictates its target binding and dissociation. *Sci Adv*. 2019;5(11):eaaw9807. doi: 10.1126/sciadv.aaw9807.

### CREATION OF MICE CARRYING TARGETED SCALE REARRANGEMENTS IN PERICENTROMERIC REGION OF CHROMOSOME 1

E.A. Chuyko<sup>1,2\*</sup>, A. Nurislamov<sup>2,3</sup>,  
I.A. Serova<sup>1,2</sup>, O.L. Serov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630090, Novosibirsk, prospect Lavrentiev, 10

<sup>2</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk  
National Research Medical Center of the Russian  
Academy of Sciences  
634050, Tomsk, Ushaika str., 10

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, NSU  
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 1

\*e-mail: eduardchuyko@yandex.ru

**Keywords:** CRISPR/Cas9, chromosomal engineering, megabase scale deletion, microinjection, reparation, mouse, C57BL/6J.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/Cas9 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛИНИЙ ЭС КЛЕТОК МЫШИ С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЗАМЕНОЙ КОМПЛЕКСА КОГЕЗИНА НА КОМПЛЕКС КОНДЕНСИНА II В ИНТЕРФАЗЕ

A.M. Юнусова<sup>1\*</sup>, Т.А. Шнайдер<sup>1</sup>,  
А.В. Смирнов<sup>1</sup>, Н.Р. Баттулин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*e-mail: anastasiajunusova@gmail.com

**Ключевые слова:** 3D геномика, CRISPR/Cas9, ауксин-зависимая деградация белков, когезин, конденсин II, эмбриональные стволовые клетки.

Когезиновый комплекс белков является ключевым участником пространственной организации хроматина в ядре. По механизму протягивания петли ДНК когезины формируют контактные домены, опосредуя взаимодействия между удаленными друг от друга на линейной молекуле промоторами и энхансерами. Конденсин II имеет сходное с когезином строение и также способен протягивать нить ДНК, формируя петлевые структуры и участвуя в компактизации хромосом перед митозом. Однако в интерфазном ядре взаимодействию конденсина II с хроматином препятствует белок

McpH1[1]. Мы заинтересовались, способен ли конденсин II функционально заменить когезин. Для этого нам необходимо 1) провести деплецию когезина и 2) обеспечить взаимодействие конденсина II с хроматином, нокаутировав ген *McpH1*. Для решения этих задач мы воспользовались системой редактирования генома CRISPR/Cas9.

В качестве мишени мы выбрали ген *Rad21*, кодирующий клеизиноую субъединицу когезинового комплекса. Поскольку нокаут этого гена летален, мы использовали систему ауксин-зависимой деградации белков [2]. Она основана на полиубиквитинировании и деградации целевого белка, слитого с дегроновым доменом, в присутствии ауксина. Согласно протоколу двойной селекции [3] мы провели модификацию генома эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши, вставив последовательность дегрона и флуоресцентного белка перед последним кодоном гена *Rad21*. Эффективность гомозиготной модификации составила более 30%. Степень деградации целевого белка была оценена с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга и составила более 95% уже через час инкубации с ауксином. Также с помощью системы CRISPR/Cas9 мы провели нокаут гена *McpH1*. Полученные клетки в интерфазе имеют компактные профазоподобные хромосомы из-за преждевременной загрузки конденсина II на хроматин.

Таким образом, с использованием системы CRISPR/Cas9 мы получили линии ЭС клеток мыши, в которых при экспозиции с ауксином происходит замена когезина на конденсин II в интерфазе. Для оценки функциональности контактов хроматина, опосредованных конденсином II, мы планируем анализ архитектуры хроматина (Hi-C) и анализ транскриптома (SLAM-seq). Исследование выполнено за счет гранта РНФ проект № 22-74-00112.

#### Литература

- Houlard M, Cutts EE, Shamim MS et al. MCPH1 inhibits Condensin II during interphase by regulating its SMC2-Kleisin interface. *eLife*. 2021;10:e73348. doi: 10.7554/eLife.73348.
- Li S, Prasanna X, Salo VT et al. An efficient auxin-inducible degron system with low basal degradation in human cells. *Nat Methods*. 2019;16:866–869. doi: 10.1038/s41592-019-0512-x.
- Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors. *Cell Rep*. 2016;15:210–218. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.001.

### USING CRISPR/Cas9 GENOME EDITING TO CREATE MOUSE STEM CELL LINES WITH FUNCTIONAL REPLACEMENT OF COHESIN WITH CONDENSIN II DURING INTERPHASE

A.M. Yunusova<sup>1\*</sup>, T.A. Shnyder<sup>1</sup>,  
A.V. Smirnov<sup>1</sup>, N.R. Battulin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630090, Novosibirsk, Lavrentieva ave., 10

<sup>2</sup> Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2

\*e-mail: anastasiajunusova@gmail.com

**Keywords:** 3D genomics, CRISPR/Cas9, auxin-inducible protein degradation, cohesin, condensin II, embryonic stem cells.

## СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК СО СНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СУБЪЕДИНИЦ Ku-АНТИГЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

А.А. Ямских<sup>1\*</sup>, Е.С. Ильина<sup>1</sup>, Н.С. Дырхеева<sup>1</sup>,  
С.П. Медведев<sup>2</sup>, А.А. Малахова<sup>2</sup>, С.М. Закиян<sup>2</sup>,  
С.Н. Ходырева<sup>1</sup>, О.И. Лаврик<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН,

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт  
цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

\*e-mail: a.yamskikh@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** Ku-антиген, CRISPR/Cas9, HEK293A,  
HEK293FT.

Онкологические заболевания являются одной из наиболее частых причин смертности людей в мире. В последние десятилетия активно проводится поиск путей повышения эффективности противоопухолевой терапии, основанной на повреждении геномной ДНК. Один из возможных подходов — воздействие на репарацию ДНК, которая противостоит цитотоксическому действию ДНК-повреждающих агентов. Ku-антиген — гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами 69,9 кДа (Ku70) и 82,7 кДа (Ku80). Он является одним из ключевых белков репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов [1]. Поэтому перспективным направлением для разработки сопровождающей терапии к ДНК-повреждающим агентам является применение коротких ДНК-дуплексов, которые, имитируя двухцепочечные повреждения клеточной ДНК, ингибируют за счет конкуренции взаимодействие Ku-антигена с поврежденной ДНК. Предполагается, что введение таких ДНК в опухолевые клетки дезорганизует регуляцию репарации, что повысит их чувствительность к генотоксическим воздействиям и позволит применять более низкие дозы ДНК-повреждающих агентов для уменьшения побочных эффектов.

Удобной моделью для изучения указанных воздействий являются клетки со сниженным количеством Ku-антигена. В нашей работе получены клоны на основе клеточных линий HEK293A и HEK293FT со сниженным содержанием белков Ku70 или Ku80. Анализ методом ПЦР подтвердил наличие CRISPR/Cas9 индуцированных делеций в генах, кодирующих белки Ku70 или Ku80. С помощью вестерн-блот анализа с использованием антител против белков Ku70 или Ku80 в этих клонах был подтвержден сниженный уровень содержания целевых белков, а также сопутствующее снижение содержания второй субъединицы в клонах линии HEK293A. С использованием химически активных ДНК-дуплексов, содержащих дезоксирибозофосфатные остатки, продемонстрировано снижение эффективности модификации Ku70 и Ku80 белков в экстрактах полученных клеток в сравнении с экстрактами родительских клеток. Работа выполнена при поддержке РНФ, проект 19-14-00204.

### Литература

1. Zahid S et al. The multifaceted roles of Ku70/80. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(8):4134.

## CREATION OF CELL LINES WITH CRISPR-Cas9 MEDIATED DELETION OF Ku-ANTIGEN SUBUNITS

А.А. Ямских<sup>1\*</sup>, Е.С. Ильина<sup>1</sup>, Н.С. Дырхеева<sup>1</sup>,  
С.П. Медведев<sup>2</sup>, А.А. Малахова<sup>2</sup>,  
С.М. Закиян<sup>2</sup>, С.Н. Ходырева<sup>1</sup>, О.И. Лаврик<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental  
Medicine SB RAS

630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva, 8

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetic SB RAS

630090, Novosibirsk, pr. Lavrentieva, 10

\*e-mail: a.yamskikh@g.nsu.ru

**Keywords:** Ku-antigen, CRISPR/Cas9, HEK293A,  
HEK293FT.



## СОДЕРЖАНИЕ

## УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

*А.Ю. Андреев, Е.О. Осидак,  
С.Э. Аветсов, С.П. Домогатский*

Исследование эффективности мембраны коллагеновой Viscoll® для восстановления роговицы в *in vivo* моделях ..... 4

*Д.Н. Антропов, А.С. Дюма, О.В. Марков,  
Д.В. Гладких, А.М. Матвеева, А.Р. Валитова,  
Е.С. Журавлев, В.М. Голышев, П.А. Пучков,  
Д.М. Макарова, М.А. Маслов, Г.А. Степанов*

Исследование эффективности доставки искусственных мрнк липосомами 2X3-DOPE и 2X7-DOPE на моделях *in vitro* и *in vivo* ..... 5

*Н.А. Басалова, О.А. Григорьева,  
А.Е. Толстолужинская, У.Д. Дьячкова,  
М.А. Виговский, М.А. Кулебякина,  
А.Е. Толстолужинская, В.С. Попов,  
Н.И. Калинина, Ж.А. Акоюян, А.Ю. Ефименко*

Регуляция пула активированных фибробластов мезенхимными стромальными клетками как возможный механизм реверсии фиброза ..... 5

*А.Р. Билалова, А.В. Тимофеева, И.М. Кабдеш,  
Я.О. Мухамедшина, Ю.А. Челышев*

Сегменты, отдаленные от эпицентра травматического повреждения спинного мозга — потенциальная терапевтическая мишень ..... 6

*М.Е. Богомякова, Е.К. Секретова,  
К.С. Ануфриева, П.О. Хабарова, А.Н. Казакова,  
П.А. Бобровский, Т.В. Григорьева,  
А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова*

Иммуногенные свойства клеток, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека ..... 7

*С.С. Бойченко, М.А. Юнин, А.Д. Егоров*

Аденоассоциированные вирусные векторы для перепрограммирования жировых клеток ..... 8

*А.С. Бугакова, М.С. Мызина,  
Г.Ю. Юсубалиева, В.П. Баклаушев*

TIL терапия на экспериментальной модели глиомы ..... 8

*Е.А. Великанова, М.Ю. Ханова, В.Г. Матвеева,  
Е.О. Кривкина, Е.А. Сенокосова, Л.В. Антонова*

Эндотелизация сосудистых протезов *in vitro* в условиях потока ..... 9

*О.В. Володина, А.Г. Демченко, М.С. Пилкин,  
Е.В. Куршакова, Е.В. Кондратьева,  
А.В. Лавров, С.А. Смирнихина*

Подбор оптимальных вариантов праймированного редактирования для коррекции мутации F508del для лечения муковисцидоза ..... 10

*П.Е. Воробьев, И.П. Вохтанцев,  
М.И. Мещанинова, М.Р. Кабилов,  
Д.О. Жарков, М.А. Воробьева*

Молекулярная селекция sgРНК для Cas9: влияние нуклеотидных замен в неадресующей области sgРНК на свойства системы геномного редактирования ..... 10

*Ю.В. Вяткин, Д.В. Антонец,  
Д.Н. Штокало, В.Е. Раменский*

Искусственный интеллект в науках о жизни ..... 11

*Д.А. Грехнёв, А. Ошколова,  
Ю.В. Новикова, А.В. Крисанова,  
А.А. Кручинина, Е.А. Воловиков,  
Л.Д. Беликова, О.С. Лебедева,  
Е.В. Казначеева, В.А. Вигонт*

Селективное нарушение кальциевой сигнализации в разных типах нейронов пациент-специфичных моделей полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваний ..... 12

*К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, Ю.Д. Гольцева,  
И.Б. Белоглазова, Е.В. Парфенова*

Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа участвует в регуляции TGF $\beta$ 1-индуцированного мезотелиально-мезенхимального перехода в эпикардальных клетках ..... 13

*У.Д. Дьячкова, М.А. Виговский,  
Н.А. Басалова, А.А. Гарджук,  
А.Ю. Ефименко, О.А. Григорьева*

Профибротические условия изменяют состав внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток и их способность влиять на поляризацию макрофагов ..... 13

*А.А. Егорова, Т.Е. Зыкова, И.А. Сабоиев,  
Н.Е. Костина, К.А. Колошина, И. Хоффи, Ш.  
Хикель, К. Хертиг, С. Чамас, Е.А. Филипенко,  
Й. Кумлен, С.В. Герасимова, А.В. Кочетов*

Получение новых доноров для селекции картофеля с устойчивостью к холодовому осахариванию путем нокаута гена вакуолярной инвертазы ..... 14

*Д.Д. Жданов, В.Г. Блинова, Ю.А. Гладиллина,  
А.А. Абрамова, Д.Д. Елисеева*

Модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами как подход к увеличению супрессорной активности регуляторных T-клеток для регенеративной терапии рассеянного склероза ..... 15

*А.К. Зайцева, Б.С. Жоров, А.А. Костарева*

Биофизические механизмы нарушения проводимости сердца, ассоциированные с генетическим вариантом S805L в гене SCN5A ..... 15

<i>И.С. Захарова, А.И. Шевченко, Н.А. Тмоян, Е.А. Елисафенко, Е.С. Зубкова, А.А. Слепцов, М.С. Назаренко, Н.В. Желтышева, В.А. Шевченко, М.В. Ежов, В.В. Кухарчук, Е.В. Парфёнова, С.М. Закиян</i>	<i>О.И. Лаврик</i>
Клеточные модели семейной гиперхолестеринемии в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями ..... 16	Редактирование геномов и репарация ДНК ..... 23
<i>А.А. Каневская, В.А. Пантелеев, Л.А. Лисицкая, К.В. Тугаева, Н.Н. Случанко, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский, М.А. Простова</i>	<i>О.А. Левченко, С.И. Нагиева, М.И. Зайнитдинова, К.С. Кочергин-Никитский, И.О. Панчук, В.Ю. Табаков, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров</i>
Короткий аргонавт активирует нуклеазу для защиты бактерий от чужеродной ДНК ..... 17	Перманентный пропуск экзонов 11–12 в гене <i>DMD</i> для разработки терапии мышечной дистрофии дюшенна ..... 24
<i>А.А. Киселёва, Е.А. Салина</i>	<i>I. Mazunin</i>
Геномное редактирование растений как инструмент новой зелёной революции ..... 18	CRISPR split RNA may empower efficient mitochondrial genome editing with type V Cas12a effectors ..... 24
<i>Е.С. Клименко, А.К. Зайцева, А.А. Костарева</i>	<i>П.И. Макаревич</i>
Влияние мутаций в гене филamina C ( <i>FLNC</i> ) на динамику ионов кальция ..... 18	Актуальные вызовы в области генной терапии орфанных заболеваний ..... 25
<i>И.В. Копылова, А.Н. Казакова, В.О. Шендер, Г.П. Арапиди, Д.А. Грехнев, В.А. Вигонт, Е.И. Шарова, Л.О. Скородумова, Е.В. Казначеева, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, О.С. Лебедева</i>	<i>О.Г. Макеев, А.В. Коротков, М.А. Десятова, Е.А. Шуман, В.Д. Боковой, А.Б. Антонова</i>
Ранние нарушения в дофаминергических нейронах при болезни паркинсона вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2, выявленные на изогенной клеточной модели .... 19	Моделирование атопического дерматита путем подавления экспрессии генов <i>FLG</i> и <i>KIF3A</i> . 25
<i>Д.С. Коршунова, П.Д. Сафонова, Ю.Д. Окулова, Ю.Ю. Силаева, М.В. Шепелев</i>	<i>В.С. Макеева, С.П. Медведев, С.М. Закиян, А.А. Малахова</i>
Получение гуманизированных животных-продуцентов рекомбинантных белков в молоко с помощью системы CRISPR/Cas9 ..... 20	Влияние ингибиторов PARP1 на развитие окислительного стресса в срединных шипиковых нейронах ..... 26
<i>Е.З. Кочиева, М.А. Слугина, А.В. Нежданова, Г.И. Ефремов, А.М. Каминская, А.В. Щенникова</i>	<i>А.А. Малахова, В.С. Макеева, Е.В. Капитошина, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, С.П. Медведев, С.М. Закиян</i>
Эффект CRISPR/Cas9 редактирования пластидной крахмалфосфорилазы <i>PHO1A</i> у сортов картофеля <i>Solanum tuberosum</i> L. .... 20	Роль поли(АДФ-рибоза) полимеразы I в развитии нейродегенеративных заболеваний ..... 27
<i>Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова</i>	<i>А.М. Матвеева, Е.С. Журавлев, Д.В. Семенов, В.В. Власов, Г.А. Степанов</i>
Особенности ремоделирования биодegradуемых сосудистых протезов малого диаметра с антромбогенным и антимикробным лекарственным покрытием различного полимерного состава ..... 21	Подходы к функциональному исследованию генов в клетках человека с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования интронов ..... 27
<i>Н.А. Круглова, С.Е. Боровикова</i>	<i>С.П. Медведев</i>
Создание вирусоподобных частиц с Cas12a для редактирования генов корецепторов ВИЧ ... 22	Клеточные модели нейродегенеративных заболеваний до всемирного CRISPR-потопы и после ..... 28
<i>А.В. Кульбачинский, Л.А. Лисицкая, Е.В. Кропачева, А.А. Каневская, В.А. Пантелеев, М.А. Бескровная, Д.К. Аверьянов, А.Ж. Ревель-Муроз, А.В. Тяхт, М.А. Простова, А.А. Агапов, Д.М. Есюнина</i>	<i>Е.С. Минская, Е.В. Лапшин, А.В. Ряполова, Д.Т. Гурчиева, А.Н. Бровин, В.Д. Мороз, А.Д. Егоров, Н.Б. Гасанов, Б.Н. Крапивин, А.В. Карабельский</i>
Белки-аргонавты прокариот: разнообразие, функции и применение в биотехнологиях ..... 22	Разработка рекомбинантных вирусов для терапии онкологических и наследственных заболеваний ..... 28
	<i>А.О. Монакова, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, В.С. Попов, В.Ю. Балабаньян, А.Ю. Ефименко</i>
	Изучение вклада фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в реализацию регенеративных эффектов секрета мезенхимных стромальных клеток при нарушениях сперматогенеза ..... 29

<i>Д.С. Новопашина, Л.В. Саковина, Е.С. Горленко, Е.В. Иванская, О.А. Должикова, М.И. Мещанинова</i> Подходы к регуляции системы CRISPR/ Cas9 на уровне направляющей РНК .....	30	<i>С.Н. Пчелина, А.Э. Копытова, Г.Н. Рычков, Ф.М. Ибатуллин, Е.В. Григорьева, М.А. Николаев, А.Д. Изюмченко, Г.В. Байдакова, С.В. Павлова, Е.С. Яркова, Д.А. Сорогина, Е.Ю. Захарова, А.К. Емельянов</i> Новые фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы — таргетная терапия болезни паркинсона .....	36
<i>Н.А. Орлова, М.В. Синегубова, Д.Э. Колесов, Ю.А. Ходак, И.И. Воробьев</i> Геномная и фенотипическая характеристика линии клеток CHO 4BGD, полученной в результате редактирования генов систем апоптоза и аутофагии .....	30	<i>А.А. Ризванов</i> Новые горизонты: применение аденоассоциированных вирусов в генной терапии для лечения редких (орфанных) наследственных заболеваний .....	37
<i>Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, А.А. Горелова, А.Н. Ремезова, А.И. Горбунов, Т.И. Виноградова, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина</i> Экспериментальное тканеинженерное замещение различных объемов мочевого пузыря .....	31	<i>В. Rimskaya</i> Enhancing mtDNA editing efficiency through optimized CRISPR-Cas12a system .....	38
<i>М.П. Перепелкина, А.В. Прокофьев, А.В. Фомина, Е.В. Власова, М.А. Васёшенкова, Е.Д. Андреева, М.С. Ребекин, В.А. Маркова, А.Н. Стрелкова, Д.О. Рзаев, Е.В. Юрлова, К.В. Соловьев, М.Н. Рыжкова, В.К. Стуканев, Н.А. Спирина, П.М. Гершович</i> Разработка генотерапевтических препаратов на основе AAV для лечения гемофилии .....	32	<i>Р.Р. Савченко, Т.Н. Киреева, Д.И. Жигалина, А.С. Дюма, Г.А. Степанов, М.Е. Меняйло, А.А. Фролова, Н.А. Скрыбин</i> Исследование модифицирующего влияния гена XIAP на выживаемость клеток при болезни вильсона-коновалова .....	38
<i>Н.В. Пермьякова, П.А. Белавин, Т.В. Маренкова, А.А. Загорская, Ю.В. Сидорчук, Е.А. Уварова, В.В. Кузнецов, Е.В. Дейнеко</i> Нокин в геном <i>Arabidopsis thaliana</i> для создания культуры клеток- продуцентов рекомбинантных белков .....	33	<i>П.А. Сальников, А.П. Ян, П.С. Белокопытова, Э. Весна, Н.Ю. Торгунаков, Я.К. Степанчук, С.А. Тихомиров, В.А. Лукьянчикова, В.С. Фишман</i> Тканеспецифичность связи между пространственной структурой хроматина и генной экспрессией: анализ на основе мышинного локуса <i>Slc29a3/Unc5b</i> .....	39
<i>М.А. Погосова, С.В. Павлова, М.К. Маренина, М.Е. Блохин, С.П. Медведев, С.М. Закиян</i> Подходы к оценке активности агонистов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами, в культурах клеток млекопитающих .....	33	<i>С.А. Самарина, А.С. Цыбко, В.С. Науменко, Т.В. Ильчибаева</i> Исследование функциональной роли гетерокомплекса 5-HT <sub>7</sub> -TrkB <i>in vitro</i> .....	39
<i>У.И. Поденкова, Е.И. Бахмет, А.С. Цимоха</i> Эск мыши, нокаутные по генам субъединиц иммунопротеасомы PSMB9 и PSMB10, сохраняют экспрессию OCT4 в ранней дифференцировке в эндодермальном направлении .....	34	<i>Л.Е. Сдобникова, И.А. Чекмарева, А.В. Ревещин, Г.В. Павлова, С.В. Сдобникова</i> Особенности ангиогенеза при диабетической ретинопатии .....	40
<i>А.В. Прокофьев, А.Н. Стрелкова, Д.О. Рзаев, В.К. Стуканев, Е.В. Юрлова, К.В. Соловьев, А.А. Оленев, М.Н. Рыжкова, П.М. Гершович</i> Разработка препарата на основе онколитических энтеровирусов для терапии онкологических заболеваний .....	35	<i>Ю.В. Сидорчук, П.А. Белавин, Е.С. Хайрулина, Д.Е. Самодуров, Е.В. Дейнеко</i> Инструменты редактирования для повышения эффективности трансформации генома хлоропластов .....	41
<i>К.А. Проняева, С.В. Павлова, С.М. Закиян, Е.В. Дементьева</i> Роль генетического варианта p.Asn515del в гене <i>MYBPC3</i> в формировании патологического фенотипа кардиомиоцитов <i>in vitro</i> .....	36	<i>В.Н. Слаутин, Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова</i> Применение фукоксантина приводит к усилению антифибротического и противовоспалительного действия плацентарных ММСК при фиброзе печени .....	41
		<i>А.В. Смирнов, А.С. Рыжкова, А.М. Юнусова</i> Применение CRISPR/Cas9 и ddPCR для поиска факторов, влияющих на частоты структурных перестроек в ЭС клетках мыши .....	42

<i>Д.А. Сорогина, А.В. Шубкин, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, Е.С. Яркова, С.П. Медведев, А.А. Малахова, С.М. Закиян</i> Клеточная платформа на основе ИПСК, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона для изучения влияния патогенного варианта T1492G гена <i>GLUD2</i> на фенотип нейральных производных	43	<i>Т.А. Шнайдер, К.Н. Морозова, А.А. Хабарова, С. Четкина, А. Чвилева, А. Юнусова, Е. Вольф, Е.В. Киселева, И.Е. Пристяжнюк</i> Изучение синдрома Козна на основе пациент-специфичных ипск с мутацией в гене <i>COH1</i>	49
<i>Ю.С. Стафеев, С.С. Мичурина, М.А. Болдырева, М.Ю. Агарёва, В.А. Труонг, М.Ю. Меньшиков, Ю.Ч. Ху, Е.В. Парфёнова</i> Использование нередактирующих crispr систем для активации канонического и неканонического термогенеза белых адипоцитов	44	<i>А.Е. Шульгина, С.В. Павлова, С.М. Закиян, Е.В. Дементьева</i> Влияние генетического варианта с.1977G>A (p.M659I) в гене <i>MUN7</i> с неясным клиническим значением на морфологию кардиальных производных индуцированных плюрипотентных клеток	50
<i>Е.В. Сухинина, П.К. Козлова, К.В. Невская, Н.В. Литвяков, А.Г. Першина</i> Создание модельных клеточных линий рака молочной железы с повышенной экспрессией гена <i>MUC</i>	44	<i>Я. Юй, А.Ю. Андреев, О.С. Роговая, Е.О. Осидак</i> Трансплантация культивированных лимбальных стволовых в составе тканеинженерной конструкции с целью лечения лимбальной недостаточности у экспериментальных животных	51
<i>А.Е. Толстолужинская, М.Н. Карагяур, Н.А. Басалова, А.Ю. Ефименко</i> Применение механизма транс-сплайсинга для создания клеточной модели фиброза	45	<i>И.А. Яковлев, А.М. Емелин, Я.С. Слесаренко, И.С. Лимаев, Ю.А. Ветрова, Е.В. Кузубова, В.М. Покровский, П.А. Лебедев, С.Н. Бардаков, А.А. Исаев, Р.В. Деев</i> Анализ эффективности двухвекторной системы на основе ААВ для лечения дисферлинопатии в доклиническом исследовании	51
<i>Т.С. Усенко, К.С. Башарова, А.И. Безрукова, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, Г.В. Байдакова, С.П. Медведев, И.В. Милыхина, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина</i> Ингибирование киназной активности LRRK2 влияет на функцию глюкоцереброзидазы в дофаминергических нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью паркинсона, ассоциированной с мутациями в генах <i>LRRK2</i> и <i>GBA1</i>	46	<i>Е.С. Яркова, Е.В. Григорьева, С.В. Павлова, Д.А. Сорогина, А.Е. Копытова, Г.В. Байдакова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, С.М. Закиян</i> Клеточные модели, демонстрирующие влияние генетических вариантов гена <i>GBA</i> на развитие болезни Паркинсона	52
<i>Е.А. Хабарова, П.И. Пилипенко, Н.П. Денисова, Ф.А. Ефремов</i> Динамика двигательных проявлений у пациентов с болезнью Паркинсона при нейростимуляции субталамического ядра	47	<b>ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ</b>	
<i>И.В. Черников, И.К. Бачкова, Д.В. Гладких, М.И. Мещанинова, М.С. Купрюшкин, С.А. Жуков, В.В. Власов, М.А. Зенкова, Е.Л. Черноловская</i> Противоопухолевые конъюгаты малых интерферирующих рнк	47	<i>Д.С. Аболин, А.Д. Смыслов, О.С. Роговая, Е.П. Калабушева, О.Л. Черкашина, Е.А. Воротеляк</i> Влияние ингибирования YAP — сигналинга на появление сократительного фенотипа фибробластов человека в эквиваленте дермы	54
<i>М.Ю. Шарикова<sup>†</sup>, Д.В. Голиусова<sup>†</sup>, И.В. Копылова, М.В. Терякова, О.С. Лебедева, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i> Экспрессия гена <i>FLNC</i> в клеточной модели <i>FLNC</i> -ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии	48	<i>М.Ю. Агарёва, Ю.С. Стафеев, С.С. Мичурина, Е.С. Зубкова, Е.А. Шестакова, А.О. Гаврилова, М.С. Синеокая, Е.И. Ратнер, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова, М.В. Шестакова</i> Иньекции семаглутида активируют адипогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток пациентов с СД2Т	54
<i>А.И. Шевченко, А.М. Арссан, Д.Е. Поливцев, С.П. Медведев, С.М. Закиян, И.С. Захарова</i> Наивные плюрипотентные стволовые клетки человека: моделирование заболеваний и CRISPR-технологии	49	<i>А.Д. Александрова, А.О. Гайдамака, Е.А. Воротеляк</i> Функциональное значение популяции CD90 <sup>+</sup> клеток стромы эндометрия мыши	55

<i>С.С. Андреева, Е.К. Карсунцева, А.Д. Воронова, А.В. Чадин, В.С. Шишкина, Г.А. Фурса, А.В. Федоров, О.В. Степанова, В.П. Чехонин</i> Выявление сроков развития признаков болезни Альцгеймера при экспериментальном моделировании на самцах и самках крыс .....	56	<i>А.В. Горохова, Е.Д. Порохова, Т.Ф. Насибов, А.Н. Дзюман</i> Остеогенный потенциал композитных имплантатов с кальцийфосфатным покрытием, модифицированным атомами цинка и/или галлуазитом .....	63
<i>С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева</i> Толерантность к физической нагрузке у крыс на фоне интрамиокардиальной инфузии бесклеточного материала во время инфаркта миокарда и после формирования постинфарктного кардиосклероза .....	56	<i>О.В. Градов, М.А. Градова</i> От синтетической биологии с использованием CRISPR к CRISPR-протобиологии и моделям эволюционной биологии развития (форсайт-анализ) .....	64
<i>Ф.С. Ахатова, И.Д. Гурьянов, Е.А. Науменко</i> Нано- и микроразмерные носители для адресной доставки природного противоопухолевого препарата продигоизина ...	57	<i>Д.А. Гурский, М.С. Мызина, Г.М. Юсубалиева, В.П. Баклаушев</i> Опухоль-ассоциированные мск при моделировании глиомы in vitro и in vivo .....	64
<i>Е.А. Ахметова, О.В. Сергеева, Т.С. Зацепин</i> Алкансульфонильные модификации гидовой РНК .....	58	<i>М.А. Десятова, А.В. Коротков, С.Б. Антонова, О.Г. Макеев</i> Экспрессия гена <i>FLG</i> не является ключевым маркером атопического дерматита .....	65
<i>М.А. Бескровная, А.А. Агапов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский</i> Белки-аргонавты прокариот как сенсоры модификаций ДНК .....	58	<i>О.А. Должикова, М.И. Мещанинова, Д.С. Новопашина</i> Создание CRISPR/Cas9 системы с возможностью аллостерической регуляции на уровне направляющей РНК .....	66
<i>А.Р. Билалова, А.В. Тимофеева, И.М. Кабдеш, Я.О. Мухамедшина, Ю.А. Челышев</i> Сегменты, отдаленные от эпицентра травматического повреждения спинного мозга — потенциальная терапевтическая мишень .....	59	<i>А.С. Деме, П.Е. Карицкая, Н.С. Васильева, Г.А. Степанов</i> Использование системы CRISPR/Cas13d для подавления регулятора апоптоза <i>xiap</i> в клетках глиобластомы .....	66
<i>С.Е. Боровикова, Н.А. Круглова</i> Конструирование и оптимизация библиотеки GPI-заякоренных пептидов для скрининга в вирусологических тестах .....	60	<i>М.И. Ездакова, Д.К. Матвеева, А.Ю. Ратушный</i> Роль сенесцентных мезенхимальных стромальных клеток в регуляции функциональной активности эндотелиальных клеток .....	67
<i>М.А. Вигровский, Н.А. Басалова, У.Д. Дьячкова, М.С. Арбатский, В.С. Попов, А.Е. Толстолужинская, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Профибротическое микроокружение индуцирует нетипичную сенесценцию мезенхимных стромальных клеток .....	60	<i>Д.В. Еремин, Н.В. Хоцкин, В.С. Науменко, А.С. Цыбко</i> Влияние сверхэкспрессии белка <i>CDNF</i> в гиппокампе на серотониновую систему мозга и поведение у мышей .....	67
<i>М.С. Гилева, Е.Г. Уфимцева, В.В. Козлов, Л.Ф. Гуляева</i> Ex vivo метод в характеристике клеток немелкоклеточного рака легкого .....	61	<i>Д.Н. Задорина, О.С. Арташян</i> Тучные клетки щитовидной железы при общем термическом воздействии .....	68
<i>И.А. Говорова, О.И. Сулягина, С.Ю. Никиточкина, Е.А. Воротеяк</i> Влияние вертепорфина на YAP+ клетки органоидов постнатальных легких мышей .....	62	<i>Ю.С. Зайцева, А.А. Агапов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский, Л.А. Лисицкая</i> Направленное расщепление ДНК-мишеней бактериальным белком-аргонавтом с помощью РНК-гидов .....	69
<i>Д.В. Голиусова, М.Ю. Шарикова, И.В. Копылова, М.В. Терякова, О.С. Лебедева, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i> Получение изогенной клеточной модели <i>FLNC</i> -ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии методом праймированного редактирования .....	62	<i>Е.В. Капитошина, С.П. Медведев, С.М. Закиян, А.А. Малахова</i> Создание клеточной модели болезни Паркинсона для изучения влияния мутации с.6055G>A в гене <i>LRRK2</i> на окислительно-восстановительный потенциал глутатиона .....	69

<i>Н.С. Карпова, О.П. Дмитренко, М.К. Нурбеков</i> Роль полиморфизмов гена <i>ZNF831</i> в развитии анемии во время беременности .....	70	<i>Е.И. Моргун, М.С. Шитова, С.А. Шелег, И.С. Изюмов, Е.П. Калабушева, О.Л. Черкашина, Е.А. Воротеляк</i> Паттерны экспрессии <i>RIPK3</i> в фибробластах человека под воздействием <i>TGF-β</i> — противоречивый результат .....	76
<i>П.А. Коновалов, А.А. Глухов, А.А. Андреев, Н.О. Михайлов, С.С. Захарова</i> Обработка экспериментальных ран мелкодисперсным потоком воды, обогащенной молекулярным водородом .....	71	<i>Т.Ф. Насибов, Е.Д. Порохова, А.В. Горохова, А.Н. Дзюман</i> Остеогенный потенциал композитных имплантатов с кальцийфосфатным покрытием, модифицированным атомами меди и/или галлуазитом .....	77
<i>В.А. Короленя, К.С. Севостьянова, К.А. Гаврилов, А.И. Шевела, М.Л. Филипенко, М.А. Сметанина</i> Локус <i>cg06256735</i> , расположенный в регуляторном районе гена <i>MFAP5</i> , гипометилирован в интимальном слое стенки вены при варикозной болезни нижних конечностей .....	72	<i>В.С. Овечкина, П.С. Суворова, С.К. Андрианова, А.А. Можаяев, В.В. Белоусов</i> Создание молекулярно-клеточных инструментов для термогенетической стимуляции клеток человека .....	78
<i>А.М. Короткова, А.И. Скрипилева, А.В. Вихорев, Е.В. Колосовская, С.В. Герасимова, Е.К. Хлесткина</i> Исследование механизмов формирования признака пленчатости/голозерности ячменя на модели изогнутых линий, полученных методом редактирования генома .....	72	<i>Е.О. Осидак, А.Ю. Андреев, Я. Юй, О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк, С.П. Домогатский</i> Концентрированные растворы коллагена: новый подход к трансплантации клеток .....	78
<i>К.Ю. Краснер, М.А. Суровцева, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким, Е.В. Чепелева, А.Н. Трунов, В.В. Черных, О.В. Повещенко</i> Оценка терапевтического эффекта стромальных клеток роговицы человека, выделенных из лентикулярного биоматериала после хирургического вмешательства <i>Relex Smile</i> , на процессы тканевой репарации в модели помутнения роговицы .....	73	<i>В.А. Пантелеев, Е.В. Кропачева, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский</i> Влияние условий реакции <i>in vitro</i> на селективность белков-аргонавтов прокариот .	79
<i>Е.В. Кропачева, А.А. Агапов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский</i> Ассоциированная с бактериальным аргонавтом нуклеаза принимает участие в генерации гидовых РНК .....	74	<i>Е.А. Плотникова, Э.Ф. Давлетшин, Д.К. Сабиров, А.В. Тимофеева, Р.Р. Шигапова, Т.В. Агеева, Я.О. Мухамедшина</i> Влияние дозированной двигательной нагрузки на морфо-функциональные характеристики посттравматического спинного мозга крысы .....	80
<i>Л.К. Курбатов, С.А. Хмелева, О.С. Тимошенко, К.Г. Птицын, С.П. Радько, А.В. Лисица</i> Модифицированный метод получения рекомбинантной CRISPR-нуклеазы <i>Cas12a</i> для идентификации фитопатогенов с помощью технологии DETECTR .....	74	<i>Д.Е. Поливцев, А.И. Шевченко, С.П. Медведев</i> Сравнение эффективности программируемой нуклеазы <i>Cas12a</i> ( <i>AsCpf1</i> ) в наивных и праймированных индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека ...	81
<i>К.Т. Ларичев, Е.М. Сергеева, Д.И. Каретников, Д.А. Афонников, Е.А. Салина, А.В. Кочетов</i> Создание плазмидного вектора с сортоспецифичными промоторами <i>U6</i> для геномного редактирования российских сортов картофеля ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	75	<i>Ю.В. Попова, В.Д. Бец, Е.Н. Кожевникова</i> <i>i-GONAD</i> (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) — новый метод для редактирования генома с использованием системы CRISPR/ <i>Cas9</i> .....	81
<i>Д.К. Матвеева, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова</i> Тканевой уровень $O_2$ <i>in vitro</i> как модулятор индуктивных свойств внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток .....	76	<i>Д.В. Прохорова, П.О. Толстова, М.С. Купрюшкин, И.С. Довыденко, Г.А. Степанов</i> Влияние модификаций в структуре направляющих рнк на функционирование системы CRISPR/ <i>Cas9 in vitro</i> .....	82
		<i>А.Ю. Ратушный, Д.К. Матвеева, М.И. Ездакова</i> Митомицин с изменяет секреторную активность мезенхимальных стромальных клеток .....	82

<i>А. Садек, Ю.С. Храмцова, О.В. Измestьяева, Б.Г. Юшков</i> Роль микроокружения в патогенезе нарушений сперматогенеза при действии высокой температуры ..... 83	<i>Г.А. Фурса, А.Д. Воронова, О.В. Степанова, Т.В. Кузнецова, Р.А. Полтавцева, А.В. Тарасов, А.Н. Самко, С.Н. Терещенко, В.П. Масенко</i> Роль PPAR-а в поддержании метаболического статуса кардиомиоцитов ..... 89
<i>Л.В. Саковина, Е.А. Ахметова, Д.С. Новопашина</i> 2'-модифицированные фоторасщепляемые направляющие РНК для системы CRISPR/ Cas9 с улучшенными характеристиками ..... 84	<i>М.В. Фурсов, Е.И. Асташкин, И.А. Дятлов</i> Кинетика белка Cas12a и детекция генов карбапенемаз ..... 90
<i>А.В. Санникова, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров, Л.Р. Валеева</i> Получение растений — нокауты <i>Marchantia polymorpha</i> по генам <i>TRFL</i> и определение роли белка TRFL6 в регуляции длины теломер ..... 84	<i>А.П. Цыбденова, А.С. Долодоев, Л.Н. Токтохоева, Е.С. Демина, Н.П. Рабданова, А.В. Ильина, Ю.С. Балханов, А.А. Нимаева, М.Ф. Серых, Е.Ж. Мункоева, Г.П. Носкова, М.Н. Бутуханова</i> Экспансия мезенхимальных стромальных клеток из вартонова студня пупочного канатика человека с помощью лизата тромбоцитов со сниженной концентрацией фибриногена ..... 90
<i>М.А. Сметанина, В.А. Короленя, К.С. Севостьянова, К.А. Гаврилов, А.И. Шевела, М.Л. Филипенко</i> Оценка применимости метода получения биологического материала из отдельных слоев стенки вены с использованием лазерной захватывающей микродиссекции ..... 85	<i>О.Л. Черкашина, А.Д. Смыслов, Е.А. Бутова, Э.Б. Дашинимаев, Д.С. Аболин, О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк, Е.П. Калабушева</i> Влияние YAP и TAZ на процессы регенерации эпидермиса человека ..... 91
<i>Ю.А. Таран, Р.Р. Минтаев, Д.В. Глазкова, Г.А. Шипулин, Е.В. Богословская</i> Влияние длины и структуры плеч гомологии на эффективность интеграции длинного трансгена в область разрыва, создаваемого нуклеазой Cas9 или Cpf1 ..... 86	<i>А.В. Чиринскайте, Ю.В. Сопова, П. Устабаев, Леонова Е.И.</i> GluN3A — один нокаут, множество возможностей ..... 91
<i>А.В. Федоренко, Е.А. Хомякова, А.В. Сурдина, Е.А. Воловиков, Е.К. Секретова, Л.Д. Беликова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i> Создание изогенной клеточной модели для изучения функций гена <i>UBE2A</i> на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ..... 86	<i>Э.А. Чуйко, А. Нурисламов, И.А. Серова, О.Л. Серов</i> Получение мышей с адресными масштабными перестройками в прицентромерном районе хромосомы 1 ..... 92
<i>Т.А. Франкевич, Н.В. Пермьякова, Ю.В. Сидорчук, Е.В. Дейнеко</i> Редактирование генов семейства <i>Gaut</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> и снижение агрегативности клеток в суспензионной культуре ..... 87	<i>А.М. Юнусова, Т.А. Шнайдер, А.В. Смирнов, Н.Р. Баттулин</i> Использование системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для создания линий ЭС клеток мыши с функциональной заменой комплекса когезина на комплекс конденсина II в интерфазе ..... 93
<i>Г.А. Фурса, С.С. Андрецова, О.В. Степанова, А.В. Чадин, А.С. Семкина, Е.К. Карсунцева, А.Д. Воронова, В.С. Шишкина, И.В. Решетов, В.П. Чехонин</i> Применение трансдуцированных клеток обонятельной выстилки при травмах спинного мозга ..... 88	<i>А.А. Ямских, Е.С. Ильина, Н.С. Дырхеева, С.П. Медведев, А.А. Малахова, С.М. Закиян, С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик</i> Создание линий клеток со сниженным содержанием субъединиц Ki-антигена с применением системы CRISPR/Cas9 ..... 94
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ..... 102	

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

### СТРУКТУРА ЖУРНАЛА

Журнал состоит из нескольких разделов: «Обзоры», «Оригинальные исследования», «Дискуссионные и общетеоретические работы», «Stem cells business», «От редакции», «История».

### ОБЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Правила представления рукописей: Для опубликования принимаются работы по всем рубрикам журнала, оформленные в соответствии с требованиями журнала.

Электронный вариант статьи на диске с полуторными интервалами между строчками, со стандартными полями (слева — 3 см, справа — 1 см, сверху и снизу — 2,5 см) должны быть отправлены по адресу:

1 19333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373.

Тел.: +7 (495) 646-80-76

Кроме того, все работы могут быть посланы по электронной почте, по адресу: [redaktor@celltranspl.ru](mailto:redaktor@celltranspl.ru).

Все страницы, кроме титульного листа, должны быть пронумерованы (вверху в центре). Рукописи, оформление которых не соответствует «Правилам для авторов», могут быть отклонены редакцией. Материалы, уже опубликованные в других изданиях, или находящиеся на рассмотрении в других редакциях, будут отклонены редколлегией журнала.

**Титульный лист:** На титульном листе должны быть указаны фамилии и инициалы всех авторов, название статьи, место работы (наименование кафедры или лаборатории и учреждения, где выполнена работа), 5–10 ключевых слов. Оригинальные исследования должны быть завизированы руководителем учреждения, где выполнена работа.

**Резюме:** Все статьи должны содержать резюме на русском и английском языках объемом не более 250 слов (редколлегия имеет право сокращать резюме, превышающие указанный объем). В резюме должны быть изложены цели исследования, основные процедуры (отбор объектов изучения или лабораторных животных, методы наблюдения или аналитические методы), основные результаты (по возможности, конкретные данные и их статистическая значимость) и основные выводы.

**Текст:** Текст необходимо печатать в редакторе Word на бумаге формата А4, шрифтом Times New Roman, 14 размера, без переносов. Все страницы должны быть пронумерованы вверху в центре. Материал и методы исследования должны быть описаны детально с точным указанием использованных реактивов, фирмы изготовителя и страны. Если в статье имеется описание наблюдений на человеке, не следует использовать фамилии, инициалы больных или номера историй болезни, особенно на рисунках и фотографиях. Кроме того, в таких статьях необходимо указывать, подписывал ли больной информированное согласие, есть ли одобрение этического комитета

и ученого совета учреждения, где данное исследование было выполнено. Статьи, не содержащие этой информации, будут отклонены редакцией.

При изложении экспериментов на животных следует указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета и национальным законам.

**Последняя страница:** На последней странице надо поставить подписи всех авторов, указать полностью их фамилии, имена, отчества, ученую степень, а также почтовый адрес, телефон/факс, электронный адрес автора, с которым следует вести переписку.

**Иллюстрации:** Журнал принимает в качестве иллюстраций оригинальные схемы, фотографии, микрофотографии и графики. Все рисунки и графики должны быть присланы отдельными файлами в формате tiff с первоначальным разрешением 300 dpi, линейным размером по ширине не менее 7 см. Обозначения допускаются только в распечатанном варианте или в копиях рисунков. Графики должны быть выдержаны в серо-зеленой гамме. За качество воспроизведения несоответствующих требованиям иллюстраций редакция ответственности не несет, либо они исключаются.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

**Библиографические ссылки в тексте:** все ссылки должны быть процитированы в тексте и пронумерованы последовательно, в порядке их первого упоминания в тексте, арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии со списком литературы, данным в конце статьи.

**Список литературы:** при цитировании необходимо использовать номенклатуру названий журналов, рекомендованную Index Medicus в формате NLM — список названий может быть получен в NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). Цитирование по системе автор-дата не допускается.

Должны быть упомянуты все авторы; в случае, если авторов пять или больше, перечислите первых трех и добавьте «и соавт.» (et al.). Авторский коллектив несет полную ответственность за точность и полноту всех ссылок и за правильность цитирования в тексте.

### Примеры цитирования различных литературных источников

*Журнальная статья:*

Vega K.J., Pina L, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pan-creatobiliary disease. Ann. Intern. Med. 1996; 124(II): 980–3.

*Если в томе сохраняется последовательная нумерация страниц, номер журнала можно не указывать:*

Vega K.J., Pina L., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. Ann. Intern. Med. 1996; 124: 980–3.



*Организация в качестве автора:*

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med. J. Aust. 1996; 164: 282–4.

*Автор не указан:*

Cancer in South Africa [editorial]. S. Afr. Med. J. 1994; 84: 15.

*Том с приложением:*

Shen H.M., Zhang Q.F. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect. 1994; 102 Suppl 1: 275–82.

*Том, разделенный на части:*

Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann. Clin. Biochem. 1995; 32(Pt 3): 303–6.

*Журнал, номера которого не объединяются в тома:*

Turan L., Wredmark T., Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin. Orthop. 1995; (320): 110–4.

*Физические лица в качестве авторов книги:*

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

*Редакторы, составители в качестве авторов книги:*

Norman I.J., Redfern S.J., editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

*Организация в качестве автора и издателя:*

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

*Глава в книге:*

Phillips S.J., Whisnant J.P. Hypertension and stroke. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

*Материалы конференции:*

Kimura J., Shibasaki H., editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15–19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

*Доклад на конференции:*

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O., editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

*Научный или технический отчет:*

Smith P., Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.

*Диссертация:*

Kaplan S.J. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

*Патент:*

Larsen C.E., Trip R., Johnson C.R., inventors; No-voste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

*Кодекс Федеральных правил:*

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

*Словари и аналогичные издания:*

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119–20.

*Классическая литература:*

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13–16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

*Неопубликованные материалы / Материалы в печати:*

Leshner A.I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

*Публикация из Internet:*

Poddubny I.V., Vasiliev A.V., Faizullin A.K. et al. Tissue engineering reconstruction of urethra in children suffering severe hypospladias: experimental and clinical findings. [http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES\[1\]=SHOW\\_PUBLICATION&PUBLICATION\\_ID=806](http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806).

**РАЗМЕР РУКОПИСИ****Обзорные статьи:**

не более 30 страниц машинописного текста.

**Оригинальные исследования:**

не более 15 страниц машинописного текста.

**Исторические статьи:**

не более 15 страниц машинописного текста.

**ПОДГОТОВКА СТАТЬИ К ПУБЛИКАЦИИ**

Редакция имеет право вести переговоры с авторами по уточнению, изменению или сокращению рукописи. Все присланные материалы по усмотрению редколлегии направляются для рецензирования членам редакционного совета или экспертам-консультантам в данной области. Принятые статьи публикуются бесплатно. Рукописи и оттиски статей авторам не высылаются. Редакция оставляет за собой право вносить в текст рукописей, принятых к опубликованию, терминологические, стилистические и грамматические правки, изменять количество и корректировать иллюстрации и таблицы. После опубликования в журнале «Гены & клетки» материалы могут быть размещены на сайте <http://www.celltranspl.ru>.

**Редакция журнала в обязательном порядке заключает с авторами договор о передаче авторских прав. Образец договора находится на сайте журнала.**

# INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

## JOURNAL STRUCTURE

The journal includes several sections such as «Reviews», «Original Research», «Discussion and Theoretical Background», «Stem cells business», «Editorial's», «History».

## GENERAL INSTRUCTIONS

**Submission:** Contributions to any aspect the journal covers that meet the requirements are accepted for publication.

Manuscripts must be sent to 119991 Moscow, Gubkina st. b. 3-2.

Tel. +7 (495) 646-80-76 in two copies and on disc, 1.5 line spaced with 3-cm left, 1-cm right and 2,5-cm top/bottom margins.

Besides, manuscripts except the original research may be submitted by e-mail [redaktor@celltranspl.ru](mailto:redaktor@celltranspl.ru).

All pages except the title page should be numbered (at the upper center). Manuscripts could be returned shelved to the authors unless they satisfy the General Instructions requirements. Materials published elsewhere or being under consideration by another journals will be rejected.

**Title page:** The title page should include the names of all the authors, a short running title, affiliations (names of department[s]/ laboratory[ies] and institution[s] where the work was done), 5 to 10 key words. The name, the highest academic degrees of the institution head should be provided within the brackets. The original investigation reports must be proved by the head of the institution where the study is held.

**Abstract:** A 250-word abstract should be provided for all articles. [The editorial department will edit abstracts that are too long.] The abstracts should include the aims of investigation, general procedures (selection of objects to be studied or laboratory animals, methods of investigation or analysis), results (specific findings and their statistical significance), and conclusion. Abstract will be translated into Russian by the publisher's editorial department.

**Text:** The text should be a Word-processed A4 format document in the 14-th Times New Roman font without hyphens. All pages should be numbered in the upper center. Complex formulae and citations should be signed on the margins by authors. Materials and methods of the investigation should be described in details, with the proper names of reagents used, their producers and country. In case reports, patients' names, history identifications especially in pictures or photographs should be omitted. In case of people participation in the clinical research, provide the information if they signed the informed consent as well as is there is the approval of the ethic committee and that of the scientific board of the institution where this investigation was performed. Manuscripts that do not provide this information will be rejected.

In case of reports on experimental animals, indicate if the experiment was held according to the rules of keeping and handling experimental animals accepted in your institution, the national laws and the international regulations.

**Last page:** The last page should include the signatures of all the authors, their full names, the highest academic degrees and the corresponding author's complete mailing address, telephone/fax and e-mail.

**Illustrations:** As illustrations original schemes, pictures, micrographics, diagrams are accepted for publication. All the pictures and diagrams should be provided as separate files in a tiff format with the primary resolution of 300 dpi and the linear width of not less than 7 cm. Legends are acceptable only on a printed copy or on picture copies. Diagrams should be grey and green.

The edition does not guarantee a high quality of reproduction of inappropriate illustration(s), and reserves the right not to reproduce an illustration(s) unless its quality meets the editorial requirements.

## REFERENCES

**Citation in text:** All references should be cited in the text and numbered consecutively using Arabic numbers in square brackets in accordance with the list given in the end of the article.

**Reference list:** Presentation of the references should be based on NLM formats in Index Medicus. The author-date system of citation is not acceptable. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus. The list of Index Medicus — indexed journals could be obtained at NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). All authors should be listed; if there are five authors and more, only the first three should be listed, followed by «et al.». Authors bear total responsibility for the accuracy and completeness of all references and for correct text citation.

## SPECIFIC FORMATS

### Review articles:

not more than 30 pages of typewritten text.

### Original research:

not more than 15 pages of typewritten text.

### Historical material:

not more than 15 pages of typewritten text.

## EDITORIAL ASSESSMENT AND PROCESSING

The editorial department reserves the right to consult the authors about refinement, modifying or shortening manuscripts. All contributions to the journal could be peer reviewed by members of the Editorial Board or submitted to expert consultants at the discretion of the editorial department. Accepted materials are published free of charge. Manuscripts and facsimile copies are not returned to the authors. Having been published in «Genes & Cells» materials will be published at <http://www.genescells.com>.

# BIOSCAD

## Biotechnology Company

BIOSCAD является одной из крупнейших биотехнологических инновационных компаний в России. Более 20 лет компания успешно объединяет научно-исследовательские центры мирового уровня, современное фармацевтическое и биотехнологическое производство, а также систему доклинических и клинических исследований, соответствующую международным стандартам.

Миссией BIOSCAD является улучшение и продление жизни людей посредством предоставления эффективных, безопасных и доступных комплексных решений в области лекарственного обеспечения.

BIOSCAD ведет полный цикл создания лекарственных препаратов: от поиска молекулы и генной инженерии до массового производства и маркетинговой поддержки. Препараты компании предназначены для терапии онкологических, аутоиммунных и других социально значимых заболеваний. Продуктовый портфель в настоящее время состоит из 63 лекарственных препаратов, из которых 10 — оригинальные, а 23 продукта — биологические. Более 40 продуктов находятся на разных стадиях разработки.

В BIOSCAD работает более 3000 человек, из которых треть — ученые и исследователи.



# HEALTH NET

Инфраструктурный центр



Оборудование, расходные материалы и реактивы  
от европейских производителей и их аналоги  
из России и Китая

## Life Sciences

- Клеточная биология
- Молекулярная биология
- Протеомика
- Общелабораторное оборудование
- Расходные материалы и реагенты



**BIOFIL**®



Биолабмикс

**BIOBASE**



BIOER

**BIOLGIX**



**Servicebio**®



## Амплификация на любой вкус

- › Изотермическая амплификация
- › Классическая ПЦР
- › Амплификация в реальном времени
- › ОТ-ПЦР одношаговым методом
- › ПЦР длинных фрагментов

Новосибирск  
w/a: +7 (905) 951-07-48  
офис: +7 (383) 363 22 40  
e-mail: sales@biolabmix.ru

Москва  
w/a: +7 (962) 828-27-96  
e-mail: moscow@biolabmix.ru

  
Биолабмикс®



Официальный дистрибьютор ООО «БМТ»  
117342, г. Москва, ул. Бутлерова, 17Б  
+7 (495) 504 15 52, info@bmtltd.ru  
www.bmtltd.ru

Оснащение научно-исследовательских лабораторий:

- Реагенты для научных исследований
- Лабораторный и культуральный пластик
- Расходные материалы для гистологии, цитологии и криохранения
- Оборудование (ламинарные боксы, центрифуги, дозаторы, микроскопы, микроманипуляторы, антивибрационные столы, инкубаторы, системы криохранения)



 LAMSYS

 NARISHIGE  
JAPAN

 DAEIL SYSTEMS

 MINWTR 美拓

 RWD

 CITOTEST®



*helicon*



ИНСТИТУТ  
СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК  
ЧЕЛОВЕКА



ПАО «ИСКЧ» (Институт Стволовых Клеток Человека) — российская многопрофильная биотехнологическая компания, основанная в 2003 году.

Направления деятельности ИСКЧ — научные исследования, разработка, а также коммерциализация и дальнейшее продвижение на рынке собственных инновационных лекарственных препаратов и высокотехнологичных медицинских услуг.

Компания ставит целью формирование новой культуры медицинской заботы о человеке — развитие здравоохранения в области персонализированной и профилактической медицины.

### Проекты ИСКЧ охватывают следующие сегменты современных биомедицинских технологий:



генная терапия



регенеративная медицина (клеточные сервисы и препараты, тканеинженерные продукты)



медицинская генетика, в т. ч. репродуктивная (генетическая диагностика и консультирование)



биострахование



биофармацевтика (в рамках международного проекта «СинБио»)

ИСКЧ принадлежит банк персонального хранения стволовых клеток пуповинной крови Гемабанк® — крупнейший в РФ и СНГ, а также банк репродуктивных клеток человека — Репробанк® (персональное хранение и донация).

Компания вывела на рынок первый российский генотерапевтический препарат для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза — Неоваскулген®, а также инновационную медицинскую технологию применения дермальных аутофибробластов для восстановления кожи с признаками возрастных и иных структурных изменений — SPRS-терапия®.

ИСКЧ реализует социально-значимый проект по развитию лаборатории и сети медико-генетических центров Genetico® для предоставления

услуг генетической диагностики и консультирования с целью раннего выявления и профилактики наследственных заболеваний, а также патологий с генетической составляющей (включая преимплантационную генетическую диагностику, неинвазивное пренатальное тестирование, а также сервисы в области онкогенетики и биоинформатики на основе NGS /расшифровка генома человека и его интерпретация, диагностические панели на отдельные категории и случаи заболеваний).

Компания развивает свои продукты и услуги как на российском, так и на международном рынке.

ИСКЧ — первая публичная биотехнологическая компания в России, эмитент сектора РИИ Московской Биржи (тикер: ISKJ).



[www.hsci.ru](http://www.hsci.ru)



+7 (495) 646-80-76



[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)