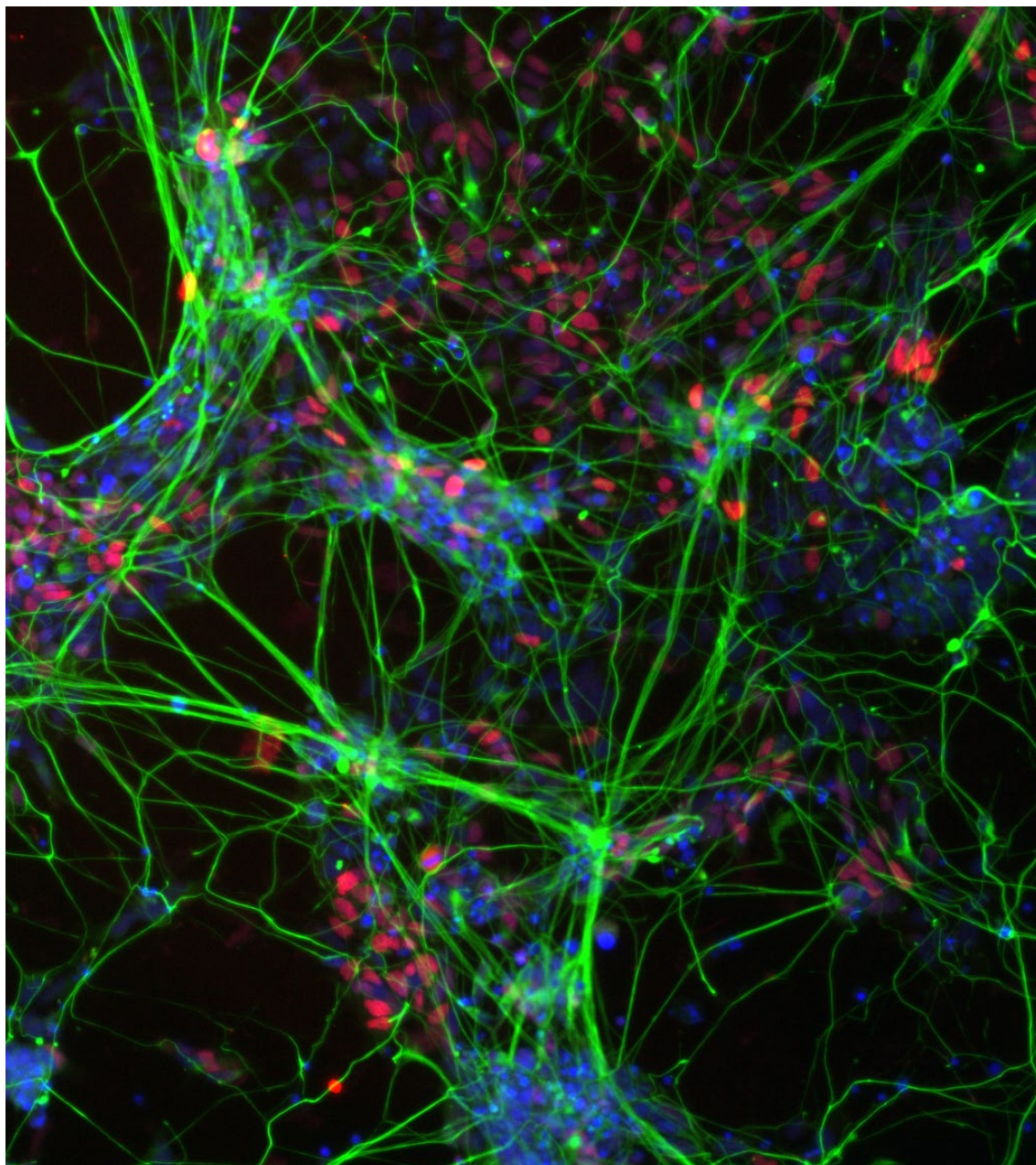


Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



Препарат Е.В. Григорьевой

МАТЕРИАЛЫ
Международного конгресса CRISPR-2018
Новосибирск, 10–14 сентября 2018 года

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

Genes & Cells

№ 2, 2018

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, О.А. Александрова
(сохранены авторские орфография, пунктуация и терминология)

МАТЕРИАЛЫ

Международного конгресса CRISPR-2018

Новосибирск
10–14 сентября 2018 года

Фото на обложке: «Нейрофиламент 200 (зеленый сигнал) и маркер клеток переднего мозга OTX2 (красный сигнал) в срединных шипиковых нейронах, полученных в процессе направленной дифференцировки ИПСК человека с CRISPR/Cas9-опосредованным нокаутом гена *HTT*».
Автор — к.б.н. Е.В. Григорьева, лаборатория эпигенетики развития, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

EDITORIAL COUNCIL

Editor-in-Chief

R.V. Deev
Human Stem Cells Institute (Moscow)
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

Executive Editor

I.Y. Bozo
Histograft, LLC (Moscow)
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

Editorial Board:

B.V. Afanasiev
I.P. Pavlov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

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
State Medical University of Russia (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
Medsi, LLC (Moscow)

Yu.I. Denisov-Nikolskyi
Research and Training Center of Biomedical Technologies RRIMAP of RAAS (Moscow)

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

P.A. Dyban
Scientific Research Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS (Saint-Petersburg)

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
Corresponding member of the RAS (Moscow)

V.A. Kozlov
Research Institute of Clinical Immunology, SB RAMS (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 Team:

A.V. Bersenev (San Francisco, USA)
A. Chogovadze (Moscow)
A.Y. Efimenko (Moscow)
I.I. Eremin (Moscow)
G. Feichtinger (Leeds, United Kingdom)
M.S. Fominyh (Saint-Petersburg)
A.S. Grigoryan (Saint-Petersburg)
P.V. Kruglyakov (Saint-Petersburg)
P.I. Makarevich (Moscow)
Ch.M. Nasadyuk (Lviv, Ukraine)
I.V. Potapov (Moscow)
V.S. Sergeev (Saint-Petersburg)
R.G. Vasiliev (Kiev, Ukraine)
N.V. Tsupkina (Saint-Petersburg)

M.R. Lichinitser
Russian N.N. Blokhin Scientific Center of Oncology (Moscow)

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
N.N. Blokhin Institute of Children's Oncology (Moscow)

Sh.M. Mitalipov
Oregon Health and Science University (Beaverton, USA)

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

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
S.P. Botkin City Clinical Hospital (Moscow)

Ye.V. Parfyonova
Moscow State University (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
Insitute of Cytology of RAS (Saint-Petersburg)

V.V. Tsymborg
«Biovitrum» Co. Ltd. (Moscow)

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

Р.В. Деев

Институт стволовых клеток человека (Москва)

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

Ответственный редактор

И.Я. Бозо

ООО «Гистографт» (Москва)

Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

Участники редакционного совета:

В.С. Акатов

Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН (Пушино, Московская обл.)

Б.В. Афанасьев

Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург)

В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

А.С. Брюховецкий

Российский государственный медицинский университет (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

ООО «Медси»

Г.Д. Далгатов

Федеральный научно-клинический центр
оториноларингологии ФМБА России (Москва)

Ю.И. Денисов-Никольский

Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

А.А. Докторов

Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

П.А. Дыбан

Научно-исследовательский институт экспериментальной
медицины СЗО РАМН (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

Член-корреспондент РАН (Москва)

В.А. Козлов

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (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)

Адрес редакции:

119333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373

Тел./факс: +7 (495) 734-91-70

E-mail: redaktor@celltranspl.ru

Присылать материал для публикации, ознакомиться
с правилами для авторов, оформить подписку можно
в Интернете по адресу: 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

Редакционная коллегия:

А.В. Берсенев (Сан-Франциско, США)

Р.Г. Васильев (Киев, Украина)

А.С. Григорян (Санкт-Петербург)

И.И. Еремин (Москва)

А.Ю. Ефименко (Москва)

П.В. Кругляков (Санкт-Петербург)

П.И. Макаревич (Москва)

К.М. Насадюк (Львов, Украина)

И.В. Потапов (Москва)

В.С. Сергеев (Санкт-Петербург)

Г. Файштингер (Лидс, Великобритания)

М.С. Фоминых (Санкт-Петербург)

Н.В. Цупкина (Санкт-Петербург)

А.Г. Чоговадзе (Москва)

М.Р. Личиницер

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва)

А.А. Масчан

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

С.А. Матвеев

Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова (Москва)

Г.Л. Менткевич

НИИ детской онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва)

Ш.М. Миталипов

Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

Б.Б. Мороз

Федеральный медицинский биофизический центр им.

А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

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

Московский государственный университет (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)

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» (Москва)

Е.И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Электронная версия журнала www.genescells.ru

ISSN электронной версии: 2500-2562

Свидетельство о регистрации

Эл № ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И. Яковлев

Корректор Н.В. Квашина

Верстка С.А. Климентовский

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

**CRISPR
2018**

10-14 сентября 2018
Новосибирск, Россия

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС
CRISPR-2018

Организаторы



При поддержке



Инфопартнеры



Партнеры



Спонсоры

Генеральный спонсор

Почетный спонсор

Золотой спонсор



Серебряные спонсоры



Бронзовые спонсоры



СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ	14	<i>S. Svitashhev</i> Precision plant breeding using CRISPR-Cas9 technology	22
<i>Д.Ю. Гушин</i> Метод безмаркерной коселекции для редактора оснований Cas9-Tad10.7 с помощью модификации натрий-калиевого насоса АТР1 в клетках человека	14	УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ	23
<i>L. Fedorov</i> CRISPR/Cas9 for mouse genome editing in vivo	15	<i>А.А. Анучина, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров</i> Повышение эффективности гомологичной репарации при геномном редактировании с помощью системы CRISPR-Cas9	23
<i>М.Н. Карагяур, Д.Т. Дыйканов, К.Ю. Кулебякин, Т.Н. Кочегура, М.В. Шестакова, И.И. Дедов, В.А. Ткачук</i> Новая индуцируемая система экспрессии для регуляции активности системы редактирования генома CRISPR/Cas9	15	<i>А.А. Атемасова, Е.В. Лопатухина, А.А. Зотова, Д.В. Мазуров</i> Функциональная характеристика нокаутных клеток, полученных методом нокина GPI-заякоренных эпитопных тагов	24
<i>М.Н. Карагяур, Д.Т. Дыйканов, К.Ю. Кулебякин, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко, Н.А. Александровская, В.А. Ткачук</i> Система рекомбинирующих лентивирусных частиц для доставки программируемых нуклеаз в культуры первичных клеток	16	<i>К.Р. Валетдинова, В.С. Овечкина, С.М. Закиян</i> Редактирование однонуклеотидной замены с.840 С>Т в 7 экзоне гена SMN2 как потенциальный способ коррекции спинальной мышечной атрофии	25
<i>М.Н. Карагяур, А.В. Степанова, К.Ю. Кулебякин, Д.Т. Дыйканов, Т.Н. Кочегура, А.И. Ростовцева, В.А. Ткачук</i> Создание линии клеток ASC52telo, конститутивно экспрессирующих программируемую нуклеазу eSpCas9	17	<i>А.С. Ветчинова, Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамычева, Е.В. Новосадова, И.А. Гривенников, С.Н. Иллариошкин</i> Геномное редактирование с использованием CRISPR/CAS9 в изучении клеточных моделей болезни паркинсона	26
<i>М.Н. Карагяур, М.С. Казарновский, Д.Т. Дыйканов, Ю.П. Рубцов, В.А. Ткачук</i> Разработка подхода профилактики иммунной элиминации клеток, подвергшихся редактированию генома или генной терапии	18	<i>И.П. Вохтанцев, А.В. Ендуткин, Л.М. Кулишова, Д.В. Ким, Д.О. Жарков</i> Влияние повреждений ДНК в протоспейсере и РАР на эффективность расщепления системой Cas9/sgRNA	27
<i>М.И. Котлов, Д.К. Армянинова, Д.С. Карпов</i> Разработка и совершенствование систем CRISPR/Cas для редактирования генома дрожжей	19	<i>Е.В. Григорьева, А. Сурумбаева, Т.Б. Маланханова, Е.В. Киселёва, А.А. Малахова, С.М. Закиян</i> Создание клеточных моделей, несущих мутации в гене НТТ, для изучения болезни Гентингтона	28
<i>О.И. Лаврик</i> Репарация ДНК — ключевой механизм, обеспечивающий стабильность генома	20	<i>S.D. Dangol, M.E. Caliskan, A. Bakhsh</i> An insight into gene editing technologies and role of CRISPR in plant improvement	29
<i>С.П. Медведев, В.Р. Коваленко, С.М. Закиян</i> Применение CRISPR-опосредованных систем и генетически кодируемых биосенсоров для создания и исследования клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний	21	<i>А.О. Жданова, А.Л. Русанов, А.В. Лисица, Н.Г. Лузгина</i> К вопросу о правовом статусе эмбрионов человека как объекте биомедицинских научных исследований	29
<i>В. Skryabin, T. Rozhdestvensky, L.V. Gubar, B. Seeger, H. Kaiser, A. Stegemann</i> What kind of mouse model do you need? Using the CRISPR/cas9 system for mouse genome modification	21	<i>М.К. Живень, И.С. Захарова, А.М. Смирнова, А.И. Шевченко, К.Е. Орищенко, Е.А. Елисафенко, С.М. Закиян</i> CRISPR/Cas9-опосредованное получение генетически модифицированной линии плюрипотентных стволовых клеток человека, экспрессирующих HIF — фактор, индуцируемый гипоксией	30

Е.С. Журавлев, И.П. Вохтанцев, Л.М. Кулишова, В.А. Рихтер, Д.О. Жарков, Г.А. Степанов Модификации нуклеотидов sgRNA в комплексе Cas9/sgrNA вызывают накопление одноцепочечных разрывов в ДНК-субстрате	31	В.А. Кузьминова, А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, В.И. Степаненко, Ю.А. Землянская, Н.А. Арефьева, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, Г.В. Юринова, В.И. Злобин Структура CRISPR/Cas-системы в геноме штамма <i>Staphylococcus aureus</i> TW20 и спектр идентифицируемых CRISPR-кассетой фаговых рас	39
Н.А. Золотарев, О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев CRISPR/Cas9 для изучения архитектурных белков хроматина <i>Drosophila melanogaster</i>	32	С.В. Кулемзин, А.А. Князева, А.С. Смагина, Т.Н. Беловежец, А.А. Горчаков, А.В. Таранин Получение НК-клеточных линий с улучшенными терапевтическими свойствами	40
А.А. Зотова, А.А. Атемасова, Е.В. Лопатухина, А.Н. Взорев, А.В. Филатов, Д.В. Мазуров Поиск факторов репликации HIV-1 и HTLV-1 с помощью скрининга библиотеки нокауты GeCKO	33	А.В. Лавров, Г.Г. Вареников, Е.В. Кондратьева, М.Ю. Скоблов Целенаправленное однонуклеотидное редактирование позволяет корректировать сотни патогенных вариантов наследственных заболеваний	41
К.А. Иванова, С.В. Герасимова, А.А. Егорова, Е.Г. Комышев, М.А. Генаев, Д.В. Домрачев, К.А. Колошина, А.В. Кочетов, Е.К. Хлесткина Применение системы редактирования генома Cas9/gRNA для доместикации картофеля de novo	34	Д.В. Мазуров Новый метод селекции отредактированных клеток путем нокина коротких GPI- заякоренных эпитопных тагов.	42
О.И. Кершанская, Ж. Кули, А. Мауленбай, Д. Нелидова, К.Р. Утеулин, С.Н. Нелидов, Дж. Стефенс Разработка новой CRISPR/Cas9 технологии редактирования генов для создания элитных сортов ячменя в Казахстане и Великобритании	35	Т.Б. Маланханова, А.К. Сурумбаева, Е.В. Григорьева, А.А. Малахова, С.М. Закиян Моделирование болезни Гентингтона на основе изогенных линий ИПСК с использованием CRISPR/Cas9	43
Д.В. Ким, Л.М. Кулишова, Н.А. Торгашева, Д.О. Жарков Получение линий клеток человека, дефицитных по генам эксцизионной репарации оснований и mismatch-репарации, с использованием системы CRISPR/Cas9	36	Е. Павлова, А. Морозов, Д. Пазс-Эспино, И. Белалов Степенной закон распределения CRISPR-Cas систем	44
А.Н. Князев, И.В. Киров, А.С. Мамаева, Д.Д. Харлампиева, В.Г. Згода, В.Н. Лазарев, В.М. Говорун, И.А. Фесенко Поиск функциональных коротких открытых рамок считывания растений на примере модельного объекта <i>Physcomitrella patens</i>	37	К.Д. Рысенкова, Е.В. Семина, М.Н. Карагяур, А.А. Шмакова, К.А. Рубина, В.А. Ткачук Нокаут гена урокиназного рецептора (PLAUR) с помощью CRISPR/Cas9 для снижения пролиферации и инвазии нейробластомы	45
А.Н. Кораблев, И.Е. Пристяжнюк, Ю.М. Минина, И.А. Серова, В.С. Фишман, Т.С. Рождественский, Л. Губарь, Б.В. Скрябин, О.Л. Серов Получение мышей с хромосомными перестройками гена <i>Cntn6</i> при помощи CRISPR/Cas9 технологии и их характеристика	38	Ю.В. Сидорчук, А.С. Щелокова, Н.В. Пермькова, Е.В. Дейнеко Исследование агрегативности суспензионной клеточной культуры <i>Arabidopsis thaliana</i> с нокаутом гена GAUT1	47
А.В. Кузьменко, Д.А. Юдин, Е.В. Кропачева, А.В. Олина, А.А. Котов, С.С. Рязанский, Д.М. Есюнина, А.А. Аравин, А.В. Кульбачинский Бактериальные белки-Аргонавты как потенциальный инструмент для редактирования геномов	39	А.В. Смирнов, А.М. Юнусова, Н.Р. Баттулин Увеличение эффективности CRISPR/ Cas9 опосредованного трансгеноза с помощью сверхэкспрессии белков, участвующих в репарации ДНК	48
		Г.А. Степанов, М.В. Сергеева, С.П. Медведев, А.А. Малахова, Е.Д. Андреева, А.- П.С. Шурыгина, А.Н. Горшков, М.М. Тимофеева, Е.А. Балахонова, М.П. Грудинин, В.А. Рихтер, А.Б. Комиссаров Геномный нокаут факторов противовирусной устойчивости для создания клеточных линий для продукции штаммов вируса гриппа	49

<i>Е.И. Устьянцева, Л.М. Кулишова, С.П. Медведев, Д.О. Жарков, С.М. Закиян</i> Доставка компонентов CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов: новый подход для увеличения эффективности редактирования	50	<i>A.B. Bondarenko, M.N. Gordeev, A.P. Kukhareva</i> CRISPR/Cas9 mediated knockout of interferon- induced transmembrane protein-3 (IFITM3) gene ...	59
<i>Ю.А. Филиппова, А.М. Матвеева, Е.С. Журавлев, М.М. Тимофеева, Е.А. Балахонова, В.А. Рихтер, Д.В. Семенов, Г.А. Степанов</i> Геномный нокаут с использованием CRISPR/Cas9 систем как новый путь к функциональному изучению коротких регуляторных РНК: перспективы редактирования малых ядрышковых РНК	51	<i>А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джиоев, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, В.М. Кузьминова, В.И. Злобин</i> Биоинформационный анализ CRISPR/ Cas-системы и скрининг бактериофагов через спейсеры CRISPR-кассет штаммов Staphylococcus aureus	60
<i>А.И. Шевченко, И.С. Захарова, Н.А. Рифель, Е.В. Григорьева, С.П. Медведев, С.М. Закиян</i> Репрессия и активация гена Xist посредством системы CRISPR/CAS9	52	<i>С.А. Васильев, Р.Р. Савченко, В.С. Фишман, А.А. Мурашкина, А.А. Зарубин, М.Ю. Вилкова, М.Е. Лопаткина, И.Н. Лебедев</i> Влияние протеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 на регуляцию радиационно- индуцированного ответа в нокаутной модельной системе in vitro	61
<i>М.В. Шепелев, С.В. Калиниченко, Е.К. Саакян, А.В. Дейкин, И.В. Коробко</i> Трансгенные мыши с функциональным замещением гена антитромбина III на гомологичный ген человека, полученные с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации	53	<i>А.С. Гольцова, Э.Б. Дашинимаяев</i> Моделирование CCR5Δ32 мутации в клетках человека при помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9	62
<i>М.В. Шепелев, С.В. Калиниченко, Е.К. Саакян, А.В. Дейкин, И.В. Коробко</i> Создание базовых линий трансгенных мышей с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации для последующего эффективного детерминированного транспозирования с использованием RMCE (Recombinase Mediated Cassette Exchange)	54	<i>Е.В. Григорьева, А. Сурумбаева, Т.Б. Маланханова, С.В. Павлова, С.П. Медведев, А.А. Малахова, С.М. Закиян</i> Получение астроцитов из линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, несущих репортёрную конструкцию GFAP-RFP	62
<i>А.Д. Юрина, А.М. Батырева, М.А. Кузнецова, М.В. Лебедева, Н.Е. Злобин, А.В. Бабаков, В.В. Таранов, А.А. Тимошенко, Н.В. Давыдова, А.К. Гапоненко, О.Н. Зубко, М.Н. Полякова, С.А. Патухов, Н.В. Маджарова, Л.Н. Коновалова, С.Р. Стрельникова, Р.А. Комахин, К.С. Гаврилова, А.М. Камионская, К.Г. Скрябин</i> Особенности применения технологии CRISPR/ Cas9 на различных видах растений	55	<i>Г.И. Давлетшина, В.В. Шерстюк, С.М. Закиян</i> Анализ вклада микроРНК в процесс репрограммирования соматических клеток крысы	63
СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ	57	<i>S.D. Dangol, M.E. Caliskan, A. Barakate, A. Bakhsh</i> Knockout of potato invertase inhibitor gene by CRISPR/Cas9 based approach	64
<i>Н.В. Андреева, Н.Г. Гурская, А.К. Бейлин, Е.А. Воротеляк</i> Создание модели болезни буллезный эпидермолиз простого типа на культуре клеток HACAT с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9	57	<i>Э.Б. Дашинимаяев, А.С. Артюхов, Н.В. Мещерякова, Ю.С. Василенко, А.С. Гольцова, Д.М. Щепетов, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев</i> Нокаут генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека при помощи системы CRISPR/Cas9 и отбор мутантных клонов при помощи цифровой капельной ПЦР	64
<i>Н.А. Арефьева, Ю.П. Джиоев, А.Ю. Борисенко, Ю.С. Букин, Л.А. Степаненко, В.И. Чемерилов, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, О.Ф. Вятчина, Г.В. Юринова, О.А. Секерина, В.И. Злобин</i> Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-системы в геноме плазмиды pBT1850294 штамма Bacillus thuringiensis Bt185	58	<i>Е.В. Дементьева, С.П. Медведев, В.Р. Коваленко, Ю.В. Вяткин, Е.И. Кретов, М.М. Слотвицкий, Д.Н. Штокало, Е.А. Покушалов, С.М. Закиян</i> Исследование влияния мутаций в генах, ассоциированных с наследственной гипертрофической кардиомиопатией, с помощью пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	65
		<i>П.И. Дерябин, А.А. Грюкова, А.Н. Шатрова, Н.Н. Никольский, А.В. Бородин</i> Эффективное и направленное управление секретомом мезенхимальных стволовых клеток человека: оптимизация условий лентивирусной трансдукции и CRISPR-моделируемая секретомная инженерия	66

А.М. Зайдман, Н.Ю. Пахомова, Е.Л. Строкова, Е.Л. Черноловская, А.И. Шевченко, П.П. Лактионов, В.М. Субботин Ингибирование гена Рах3 липофильными siРНК в склеротоме — модель идиопатического сколиоза на курином эмбрионе 67	А.М. Матвеева, Ю.А. Филиппова, Е.С. Журавлев, Е.А. Балахонова, М.М. Тимофеева, Г.А. Степанов Разработка стратегии геномного редактирования и анализа активности малых ядрышковых РНК с применением системы CRISPR/Cas9 76
А.Л. Кайшева, Т.В. Федорончук, А.Н. Кривенко, К.А. Мальсагова Барьеры для развития рынков товаров и услуг в области постгеномных технологий 68	К.Н. Morozova, L.A. Suldina, T.B. Malankhanova, E.V. Grigor'eva, S.M. Zakian, E. Kiseleva, A.A. Malakhova Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/ Cas9 technology 77
B.S. Kalani, A. Azarnezhad, L. Lotfollahi, E. Ohadi, S. Razavi Analysis of the CRISPR array in <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> isolated from clinical, food, seafood and animal samples in Iran 69	Д.С. Новопашина, Е.А. Хабардина, М.И. Мещанинова, И.П. Вохтанцев, А.Г. Веняминова, Д.О. Жарков Фоточувствительные направляющие РНК для контролируемого редактирования генома 77
А.А. Котов, Е.А. Тихонова, Н.А. Золотарев, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко Исследование роли отдельных доменов белка CLAMP в процессе привлечения комплекса дозовой компенсации <i>Drosophila melanogaster</i> на участки хроматина 69	М.А. Орлов, А.А. Рясик, Е.А. Зыкова, А.А. Сорокин Промоторы бактериофагов группы Т7: дестабилизация дуплекса ДНК под воздействием суперспирализации предполагает роль в репликации 78
К.С. Кочергин-Никитский, С.А. Болух, Р.Д. Векшин, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров Разработка подходов к редактированию гена DES для нокаута аллелей, несущих мутации, вызывающие дилатационную кардиомиопатию ... 70	Е.А. Орлова, Д.А. Матвиенко, С.В. Кулемзин, А.А. Горчаков, К.О. Баранов, А.В. Таранин, Л.В. Мечетина Создание нокаутированных В-клеточных линий мыши для изучения функции белка FCRLA 79
Е.В. Кропачева, А.В. Олина, А.В. Кузьменко, А.А. Аравин, А.В. Кульбачинский Исследование нуклеазной активности белка- Аргоната из мезофильной бактерии <i>Kurthia</i> <i>massiliensis</i> 71	И.С. Осадчий, Н.А. Золотарев, О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев Изучение сборки транскрипционного комплекса на промоторах генов рибосомальных белков 80
Л.К. Курбатов, С.П. Радько, И.Ю. Торопыгин, В.Г. Згода, Н.Д. Дурманов Получение рекомбинантной рибонуклеазы CRISPR-Cas 13a для разработки тест-системы экспресс-диагностики иксодовых клещевых боррелиозов 72	С.В. Павлова, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.В. Чепелева, Е.Д. Сорокоумов, С.М. Закиян Модуляция кардиальной дифференцировки ИПСК человека с помощью Cas9-SAM активации гена SHOX2, отвечающего за пейсмейкерный путь развития кардиомиоцитов 81
Д.А. Ланшаков, Е.В. Шабурова, Н.Н. Дыгало Генетический вектор для направленной экспрессии трансгенов в катехоламинергических нейронах 73	Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, А.Ю. Гаврилова Контроль биобезопасности трансгенных растений 82
Л.С. Литвинова, К.А. Юрова, В.В. Шуплецова, О.Г. Хазиахматова, Е.С. Мелашенко, В.В. Мелашенко, Е.О. Шунькин, Ю.П. Шаркеев, Е.Г. Комарова, М.Б. Седельникова, М.И. Галецкий, М. Коржанова, И.А. Хлусов Дистантное влияние искусственного трехмерного матрикса на остеогенную дифференцировку in vitro культуры ММСК-ЖТ ... 74	Н.П. Перетолчина, Ю.П. Джиоев, Л.А. Степаненко, В.Т. Климов, А.Ю. Борисенко, Е.А. Воскресенская, В.И. Злобин Анализ CRISPR-локусов штаммов <i>Y.</i> <i>pseudotuberculosis</i> , циркулирующих на территориях Сибири и Дальнего Востока 83
Л.С. Литвинова, К.А. Юрова, В.В. Шуплецова, О.Г. Хазиахматова, Е.С. Мелашенко, В.В. Мелашенко, Е.О. Шунькин, Ю.П. Шаркеев, Е.Г. Комарова, М.Б. Седельникова, И.К. Норкин, К.И. Прокин, И.А. Хлусов Влияние шероховатости искусственного трехмерного матрикса на дифференцировку ММСК в условиях дистантного культивирования in vitro 75	Н.В. Пермякова, Ю.В. Сидорчук, Т.В. Маренкова, С.А. Хозеева, А.А. Загорская, Е.В. Дейнеко Инактивация гена gfp при помощи системы CRISPR/Cas9 в культуре суспензионных клеток <i>Arabidopsis thaliana</i> 84

<i>В.С. Скрипова, И.А. Асцатуров, Р.Г. Киямова</i> Идентификация генов, регулирующих чувствительность клеточной линии рака поджелудочной железы к платиновым препаратам, с помощью технологии CRISPR/Cas9 85	<i>А.В. Хромов, А.В. Махотенко, Е.А. Снигирь, С.С. Макарова, В.В. Макаров, Т.П. Супрунова, Н.О. Калинина, М.Э. Тальянский</i> Бесплазмидная доставка РНП-комплексов CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы растений картофеля <i>Solanum tuberosum</i> 88
<i>С.А. Смирнихина, А.А. Анучина, К.С. Кочергин-Никитский, Э.П. Адильгереева, А.В. Лавров</i> Повышение активности направляющей РНК к мутации F508del в гене CFTR при муковисцидозе 86	<i>И.А. Яковлев, И.Г. Старостина, А.А. Шаймарданова, Д.Р. Аглиуллина, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов, А.А. Исаев, Р.В. Деев</i> Создание клеточных тест-систем (моделей заболеваний) с помощью геномного редактирования для разработки и проверки методов генной терапии наследственных заболеваний мышечной ткани 89
<i>В.В. Соколов, Н.А. Золотарев, О.Г. Максименко</i> CRISPR-опосредованный мутагенез архитектурных белков Fu2 и CG1603, участвующих в регуляции Нох-генов <i>Drosophila melanogaster</i> 87	ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ 91
<i>Л.А. Степаненко, Ю.П. Джиев, О.В. Колбасеева, А.Ю. Борисенко, В.И. Злобин</i> Разработка подходов к поиску фагов через спейсерные сайты CRISPR/Cas-системы <i>Klebsiella pneumoniae</i> PittNDMO1 87	

CONTENTS

PLENARY LECTURES	14	ORAL PRESENTATIONS	23
<i>D.Yu. Guschin</i> Marker-free coselection method for the base editor Cas9-Tad10.7 using modification of ATP1 sodium-potassium pump in human cells ...	14	<i>A.A. Anuchina, S.A. Smirnikhina, A.V. Lavrov</i> Increasing homology-directed repair efficiency during genome editing with CRISPR-Cas9	23
<i>L. Fedorov</i> CRISPR/Cas9 for mouse genome editing in vivo ...	15	<i>A. Atemasova, E. Lopatukhina, A. Zotova, D. Mazurov</i> Functional characteristics of knockout cells generated via knockin of GPI-anchored epitope tags ...	24
<i>M.N. Karagyaur, D.T. Dyikanov, K.Y. Kulebyakin, T.N. Kochegura, M.V. Shestakova, I.I. Dedov, V.A. Tkachuk</i> A novel inducible system of expression for regulating the activity of CRISPR/Cas9 genome editing system	15	<i>K.R. Valetdinova, V.S. Ovechkina, S.M. Zakian</i> Editing a silent mutation in exon 7 (c. 840 C>T) of SMN2 as a potential approach to correct spinal muscular atrophy	25
<i>M.N. Karagyaur, D.T. Dyikanov, K.Y. Kulebyakin, P.I. Makarevich, A.Y. Efimenko, N.A. Aleksandrushkina, V.A. Tkachuk</i> A system of recombinable lentiviral particles for the delivery of programmable nucleases to primary cell cultures	16	<i>A.S. Vetchinova, E.Yu. Fedotova, N.Yu. Abramychева, E.V. Novosadova, I.A. Grivennikov, S.N. Illarionovskiy</i> CRISPR/CAS9 genome editing in the studies of cell models of parkinson's disease	26
<i>M.N. Karagyaur, A.V. Stepanova, K.Y. Kulebyakin, D.T. Dyikanov, T.N. Kochegura, A.I. Rostovceva, V.A. Tkachuk</i> Creation of the ASC52telo cell line constitutively expressing the programmable nuclease eSpCas9 ...	17	<i>I.P. Vokhtantsev, A.V. Endutkin, L.M. Kulishova, D.V. Kim, D.O. Zharkov</i> The effect of DNA damage in protospacer and PAM on cleavage efficiency by Cas9/sgRNA system	27
<i>M.N. Karagyaur, M.S. Kazarnovskiy, D.T. Dyikanov, Y.P. Rubtsov, V.A. Tkachuk</i> Development of an approach to prevent the immune elimination of the cells that underwent genome editing or gene therapy	18	<i>E.V. Grigor'eva, A. Surumbayeva, T.B. Malankhanova, E. Kiseleva, A.A. Malakhova, S.M. Zakian</i> Generation of cellular models carrying mutations in the HTT gene to study Huntington's disease	28
<i>M.I. Kotlov, D.K. Artyaninova, D.S. Karpov</i> Development and improvement of CRISPR/Cas9 systems for yeast genome editing	19	<i>S.D. Dangol, M.E. Caliskan, A. Bakhsh</i> An insight into gene editing technologies and role of CRISPR in plant improvement	29
<i>O.I. Lavrik</i> DNA repair — a key mechanism to maintain genome stability	20	<i>A.O. Zhdanova, A.L. Rusanov, A.V. Lisitsa, N.G. Luzgina</i> On the issue of the legal status of human embryos as an object of biomedical research	29
<i>S.P. Medvedev, V.R. Kovalenko, S.M. Zakian</i> Application of CRISPR-mediated systems and genetically encoded biosensors for the creation and investigation of cellular models of neurodegenerative diseases	21	<i>M.K. Zhiven, I.S. Zakharova, A.M. Smirnova, A.I. Shevchenko, E.A. Elisaphenko, S.M. Zakian</i> CRISPR/Cas9-mediated obtaining of genetically modified human pluripotent stem cells expressing HIF — hypoxia inducible factor	30
<i>B. Skryabin, T. Rozhdestvensky, L.V. Gubar, B. Seeger, H. Kaiser, A. Stegemann</i> What kind of mouse model do you need? Using the CRISPR/cas9 system for mouse genome modification	21	<i>E.S. Juravlev, I.P. Vohtancev, L.M. Kulishova, V.A. Richter, D.O. Zharkov, G.A. Stepanov</i> Nucleotide modifications in sgRNAs bias Cas9 towards nickase activity	31
<i>S. Svitashvili</i> Precision plant breeding using CRISPR-Cas9 technology	22	<i>N. Zolotarev, O. Maksimenko, P. Georgiev</i> CRISPR/Cas9 for studying of chromatin architectural proteins of <i>Drosophila melanogaster</i> ...	32
		<i>A.A. Zotova, A.A. Atemasova, E.V. Lopatukhina, A.N. Vzorov, A.V. Filatov, D.V. Mazurov</i> GeCKO library screening for identification of HIV-1 and HTLV-1 replication factors	33

<i>K.A. Ivanova, S.V. Gerasimova, A.A. Egorova, E.G. Komyshev, M.A. Genaev, D.V. Domrachev, K.A. Koloshin, A.V. Kochetov, E.K. Khlestkina</i> Application of Cas9/gRNA genome editing system for potato de novo domestication	34	<i>T.B. Malankhanova, A.K. Surumbayeva, E.V. Grigor'eva, A.A. Malakhova, S.M. Zakian</i> Huntington's disease modeling based on isogenic iPSC lines using CRISPR/Cas9	43
<i>O.I. Kershanskaya, J. Kuli, A. Maulenbai, D. Nelidova, K.R. Uteulin, S.N. Nelidov, J. Stephens</i> Establishment of new gene editing CRISPR/Cas9 technology for creation of elite barley cultivars in Kazakhstan and UK	35	<i>Ye. Pavlova, A. Morozov, D. Paez-Espino, I. Belalov</i> The Power Law of CRISPR-Cas Systems	44
<i>D. Kim, L. Kulishova, N. Torgasheva, D. Zharkov</i> Generation of 293FT Cell Lines Deficient in Base Excision Repair and Mismatch Repair by CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing	36	<i>K.D. Rysenkova, E.V. Semina, M.N. Karagyaur, A.A. Shmakova, K.A. Rubina, V.A. Tkachuk</i> Knockout of the urokinase receptor gene PLAUR by CRISPR/Cas9 to reduce the proliferation and invasion of neuroblastoma	45
<i>A. Knyazev, I. Kirov, A. Mamaeva, D. Kharlampieva, V. Zgoda, V. Lazarev, V. Govorun, I. Fesenko</i> The discovery of functional small open reading frames of plants using model plant, <i>Physcomitrella patens</i>	37	<i>Yu.V. Sidorchuk, A.S. Shchelokova, N.V. Permyakova, E.V. Deineko</i> A study of cell aggregation in <i>Arabidopsis thaliana</i> suspension culture with GAUT1 gene knockout	47
<i>A.N. Korablev, I.E. Pristiyazhnyuk, Y.M. Minina, I.A. Serova, V.S. Fishman, T.S. Rozhdestvensky, L. Gubar, B.V. Scryabin, O.L. Serov</i> Generation of mice with chromosome aberrations of the <i>Cntn6</i> gene by use of CRISPR/Cas9 technology and their characteristics	38	<i>A.V. Smirnov, A.M. Yunusova, N.R. Battulin</i> Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by expressing DNA repair proteins ...	48
<i>A.V. Kuzmenko, D.A. Yudin, E.V. Kropocheva, A.V. Olina, A.A. Kotov, S.S. Ryazansky, D.M. Esyunina, A.A. Aravin, A.V. Kulbachinskiy</i> Bacterial Argonaute proteins as potential tools for genome editing	39	<i>G.A. Stepanov, M.V. Sergeeva, S.P. Medvedev, A.A. Malakhova, E.D. Andreeva, A.-P.S. Shurygina, A.N. Gorshkov, M.M. Timofeeva, E.A. Balakhonova, M.P. Grudin, V.A. Richter, A.B. Komissarov</i> Genomic knockout of antiviral resistance factors is the way to create cell lines for the production of the influenza virus strains	49
<i>V.A. Kuzminova, A.Yu. Borisenko, Yu.P. Dzhioev, N.P. Peretolchina, V.I. Stepanenko, Yu.A. Zemlyanskaya, N.A. Arefieva, V.P. Salovarova, A.A. Pristavka, G.V. Yurina, V.I. Zlobin</i> Structure of CRISPR/CAS systems in the genome systems in the genome strain <i>Staphylococcus aureus</i> TW20 and spectrum of phages ras identified by CRISPR-cassette	39	<i>E.I. Ustyantseva, L.M. Kulishova, S.P. Medvedev, D.O. Zharkov, S.M. Zakian</i> CRISPR/Cas9 delivery in form of ribonucleoprotein complexes: a novel approach to increase editing efficiency	50
<i>S.V. Kulemzin, A.A. Knyazeva, A.S. Smagina, T.N. Belovezhec, A.A. Gorchakov, A.V. Taranin</i> Generation of NK-cell lines with enhanced therapeutic potential	40	<i>J.A. Filippova, A.M. Matveeva, E.S. Juravlev, M.M. Timofeeva, E.A. Balakhonova, V.A. Richter, D.V. Semenov, G.A. Stepanov</i> CRISPR/Cas9-mediated genome knockout as a promising approach to functional analysis of short regulatory RNA: a case study of small nucleolar RNA	51
<i>A.V. Lavrov, G.G. Varenikov, E.V. Kondrateva, M. Yu Skoblov</i> Targeted single nucleotide editing allows correction of hundreds of pathogenic variants in hereditary diseases	41	<i>A.I. Shevchenko, I.S. Zakharova, N.A. Rifel, E.V. Grigor'eva, S.P. Medvedev, S.M. Zakian</i> CRISPR/CAS9 mediated downregulation and activation of <i>Xist</i> gene	52
<i>D.V. Mazurov</i> A novel method of gene-edited cell selection via knockin of short GPI-anchored epitope tags.	42	<i>M.V. Shepelev, S.V. Kalinichenko, E.K. Saakian, A.V. Deykin, I.V. Korobko</i> Transgenic mice with functional replacement of the antithrombin III gene by a homologous human gene obtained by CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination	53
		<i>M.V. Shepelev, S.V. Kalinichenko, E.K. Saakian, A.V. Deykin, I.V. Korobko</i> Generation of basic lines of transgenic mice by CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination for consequent effective and determined transgenesis by means of RMCE (Recombinase Mediated Cassette Exchange)	54

<i>A.D. Yurina, A.M. Batyрева, M.A. Kusnetzova, M.V. Lebedeva, N.E. Zlobin, A.V. Babakov, V.V. Taranov, A.A. Timoshenko, N.V. Davydova, A.K. Gaponenko, O.N. Zubko, M.N. Polyakova, S.A. Pastukhov, N.V. Madzharova, L.N. Konovalova, S.R. Strelnikova, R.A. Komakhin, K.S. Gavrilova, A.M. Kamionskaya, K.G. Skryabin</i> Special aspects of a CRISPR/Cas9 system in various plants	55	<i>S.D. Dangol, M.E. Caliskan, A. Barakate, A. Bakhsh</i> Knockout of potato invertase inhibitor gene by CRISPR/Cas9 based approach	64
POSTER PRESENTATIONS	57	<i>E.B. Dashinimaev, A.S. Artyuhov, N.V. Meshcheryakova, Y.S. Vasilenko, A.S. Goltsova, D.M. Schepetov, E.A. Vorotelyak, A.V. Vasiliev</i> Genes knockout in induced pluripotent stem cells with CRISPR/Cas9 and clones selection using droplet digital PCR	65
<i>N.V. Andreeva, N.G. Gurskaya, A.K. Beilin, E.A. Vorotelyak</i> Development of a model system for epidermolysis bullosa simplex in HACAT cells by mutagenesis of keratin 5 using CRISPR/Cas9 technology	57	<i>E.V. Dement'yeva, S.P. Medvedev, V.R. Kovalenko, Yu.V. Vyatkin, E.I. Kretov, M.M. Slotvitsky, D.N. Stokalo, E.A. Pokushalov, S.M. Zakian</i> Studying impact of mutations in genes associated with inherited hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells	65
<i>N.A. Arefieva, Y.P. Dzhioev, A.Y. Borisenko, Y.S. Bukin, L.A. Stepanenko, V.I. Chemerilova, V.P. Salovarova, A.A. Pristavka, V.A. Kuz'minova, O.F. Vyatchina, G.V. Yurina, O.A. Sekerina, V.I. Zlobin</i> Bioinformatic search and analysis of CRISPR/Cas system structures in plasmid pBT1850294 of <i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bt185	58	<i>P.I. Deryabin, A.A. Griukova, A.N. Shatrova, N.N. Nikolsky, A.V. Borodkina</i> Effective and precise managing of human mesenchymal stem cells' secretome: optimization of lentiviral transduction parameters and CRISPR-based secretome engineering	66
<i>A.B. Bondarenko, M.N. Gordeev, A.P. Kukhareva</i> CRISPR/Cas9 mediated knockout of interferon-induced transmembrane protein-3 (IFITM3) gene	59	<i>A.M. Zaidman, N.Yu. Pakhomova, E.L. Strokova, E.L. Chernolovskaya, A.I. Shevchenko, P.P. Laktionov, V.M. Subbotin</i> Inhibition of Pax3 gene by lipophilic siRNA in sclerotome as a model of idiopathic scoliosis on a chicken embryo	67
<i>A.Yu. Borisenko, Yu.P. Dzhioev, N.P. Peretolchina, L.A. Stepanenko, V.M. Kusminova, V.I. Zlobin</i> Bioinformational analysis of CRISPR/Cas systems and screening of bacteriophages through the spacers CRISPR-cassette of strains <i>Staphylococcus aureus</i>	60	<i>A.L. Kaisheva, T.V. Fedoronchuk, A.N. Krivenko, K.A. Malsagova</i> Barriers for development of markets of goods and services in the area of postgenome technologies	68
<i>S.A. Vasilyev, R.R. Savchenko, V.S. Fishman, A.A. Murashkina, A.A. Zarubin, M. Yu. Vilkova, M.E. Lopatkina, I.N. Lebedev</i> Effect of extracellular matrix proteinase ADAMTS1 on the regulation of radiation-induced response in the knockout model system in vitro ...	61	<i>B.S. Kalani, A. Azarnezhad, L. Lotfollahi, E. Ohadi, S. Razavi</i> Analysis of the CRISPR array in <i>Listeria monocytogenes</i> isolated from clinical, food, seafood and animal samples in Iran	69
<i>A.S. Goltsova, E.B. Dashinimaev</i> CRISPR/Cas9-mediated CCR5Δ32 mutation in human cells	62	<i>A.A. Kotov, E.A. Tikhonova, N.A. Zolotarev, P.G. Georgiev, O.G. Maksimenko</i> Study of functioning of domains of CLAMP protein in recruiting of dosage compensation complex of <i>Drosophila melanogaster</i> to the chromatin targets	69
<i>E.V. Grigor'eva, A. Surumbayeva, T.B. Malankhanova, S.V. Pavlova, S.P. Medvedev, A.A. Malakhova, S.M. Zakian</i> Obtaining of astrocytes from induced pluripotent stem cell lines bearing GFAP-RFP reporter construction	62	<i>K.S. Kochergin-Nikitsky, S.A. Bolokh, R.D. Vekshin, S.A. Smirnichina, A.V. Lavrov</i> Development of approaches to knockout DES alleles with mutations causing dilated cardiomyopathy	70
<i>G.I. Davletshina, V.V. Sherstyuk, S.M. Zakian</i> Analysis of the microRNA contribution to the process of rat somatic cells reprogramming	63	<i>E.V. Kropocheva, A.V. Olina, A.V. Kuzmenko, A.A. Aravin, A.V. Kulbachinskiy</i> Investigation of the nuclease activity of the ArgonAUT protein from the mesophilic bacterium <i>Kurthia massiliensis</i>	71

<i>L.K. Kurbatov, S.P. Radko, I.Yu. Toropygin, V.G. Zgoda, N.D. Durmanov</i> Reception of the recombinant CRISPR-Cas13a ribonuclease for the development of the express diagnostic test system of Lyme disease 72	<i>S.V. Pavlova, S.P. Medvedev, E.V. Dementyeva, E.V. Chepeleva, E.D. Sorokoumov, S.M. Zakian</i> Cardiac differentiation modulation by Cas9-SAM activation of SHOX2, a key gene in pacemaker development 81
<i>D.A. Lanshakov, E.V. Shaburova, N.N. Dygalo</i> Genetic vector for targeted expression of transgenes in catecholaminergic neurons 73	<i>N.E. Pavlovskaya, I.Yu. Solokhina, A.Yu. Gavrilova</i> Biosafety control of transgenic plants 82
<i>L.S. Litvinova, K.A. Yurova, V.V. Shupletsova, O.G. Khaziakhmatova, E.S. Melashchenko, V.V. Malashchenko, E.O. Shunkin, Y.P. Sharkeev, E.G. Komarova, M.B. Sedelnikova, M.I. Galetskiy, M. Korzhanova, I.A. Khlusov</i> Distant influence of an artificial three- dimensional matrix on the osteogenic differentiation in vitro of the MMSC-AT culture 74	<i>N.P. Peretolchina, Y.P. Dzhioev, L.A. Stepanenko, V.T. Klimov, A.Y. Borisenko, E.A. Voskresenskaya, V.I. Zlobin</i> Analysis of CRISPR-loci of <i>Y. pseudotuberculosis</i> strains isolating in Siberia and Far East of Russia ... 83
<i>L.S. Litvinova, K.A. Yurova, V.V. Shupletsova, O.G. Khaziakhmatova, E.S. Melashchenko, V.V. Malashchenko, E.O. Shunkin, Y.P. Sharkeev, E.G. Komarova, M.B. Sedelnikova, I.K. Norkin, K.I. Prokin, I.A. Khlusov</i> Influence of the topography of the artificial three-dimensional matrix on the differentiation of MMSC in conditions of distant cultivation by in vitro 75	<i>N.V. Permyakova, Y.V. Sidorchuk, T.V. Marenkova, S.A. Khozeeva, A.A. Zagorskaya, E.V. Deineko</i> Inactivation of the gfp gene by CRISPR/ Cas9 in <i>Arabidopsis thaliana</i> suspension cell culture 84
<i>A.M. Matveeva, J.A. Filippova, E.S. Juravlev, E.A. Balakhonova, M.M. Timofeeva, G.A. Stepanov</i> Development of CRISPR/Cas9-mediated genome editing strategy targeted at snoRNAs 76	<i>V.S. Skripova, I.A. Astsaturov, R.G. Kiyamova</i> Identification of genes regulating platinum sensitivity of pancreatic cancer cell line using CRISPR/Cas9 technique 85
<i>K.N. Morozova, L.A. Suldina, T.B. Malankhanova, E.V. Grigor'eva, S.M. Zakian, E. Kiseleva, A.A. Malakhova</i> Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/ Cas9 technology 77	<i>S.A. Smirnikhina, A.A. Anuchina, K.S. Kochergin-Nikitsky, E.P. Adilgereeva, A.V. Lavrov</i> Increase of sgRNA activity designed to F508del mutation in CFTR gene in cystic fibrosis 86
<i>D.S. Novopashina, E.A. Khabardina, M.I. Meschaninova, I.P. Vokhtantsev, A.G. Venyaminova, D.O. Zharkov</i> Photosensitive guide RNA for controlable gene editing 77	<i>V.V. Sokolov, N.A. Zolotarev, O.G. Maksimenko</i> CRISPR-mediated mutagenesis of architectural proteins Fu2 and CG1603 participating in regulation of HOX-gene cluster in <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> 87
<i>M.A. Orlov, A.A. Rysak, E.A. Zyкова, A.A. Sorokin</i> T7-like bacteriophage promoters: stress- induced DNA duplex destabilization suggests a role in replication 78	<i>L.A. Stepanenko, Yu.P. Dzhioev, O.V. Kolbaseeva, A.Yu. Borisenko, V.I. Zlobin</i> Development of approaches to searching for phages through spiser sites CRISPR/Cas systems <i>Klebsiella pneumoniae</i> PittNDM01 87
<i>E.A. Orlova, D.A. Matviyenko, S.V. Kulemzin, A.A. Gorchakov, K.O. Baranov, A.V. Taranin, L.V. Mechetina</i> Fcrla gene knockout in model murine B cell lines to study the role of FCRLA protein 79	<i>A.V. Khromov, A.V. Makhotenko, E.A. Snigir, S.S. Makarova, V.V. Makarov, T.P. Suprunova, N.O. Kalinina, M.E. Taliansky</i> DNA-free delivery of Cas9/gRNA Ribonucleoproteins (RNPs) into cells of apical meristems of <i>Solanum tuberosum</i> 88
<i>I.S. Osadchiy, N.A. Zolotarev, O.G. Maksimenko, P.G. Georgiev</i> Studying of transcription complex assembly at the promoters of ribosomal protein genes 80	<i>I.A. Yakovlev, I.G. Starostina, A.A. Shaymardanova, D.R. Agliullina, V.V. Soloveva, A.A. Rizvanov, A.A. Isaev, R.V. Deev</i> Generation of cellular test-systems (disease models) with genome editing for development and verification of methods of hereditary muscle tissue diseases gene therapy 89
	INSTRUCTIONS FOR AUTHORS 93

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ПД1

Д.Ю. Гущин

**МЕТОД БЕЗМАРКЕРНОЙ КОСЕЛЕКЦИИ
ДЛЯ РЕДАКТОРА ОСНОВАНИЙ
CAS9-TAD10.7 С ПОМОЩЬЮ
МОДИФИКАЦИИ НАТРИЙ-КАЛИЕВОГО
НАСОСА ATP1 В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА***Центр геномной инженерии, Институт
фундаментальной науки, Тэджон, Республика Корея*

D.Yu. Guschin

**MARKER-FREE COSELECTION METHOD FOR
THE BASE EDITOR CAS9-TAD10.7 USING
MODIFICATION OF ATP1 SODIUM-POTASSIUM
PUMP IN HUMAN CELLS***Center for Genomic Engineering, Institute of Basic
Science, Daejeon, Republic of Korea*

dguschin@ibs.re.kr

Введение. Геномная инженерия вообще, и CRISPR-Cas9 метод в частности, позволяет создавать клеточные модели для широкого круга биологических исследований и может быть использована в медицине при создании линий клеток для клеточной терапии. Однако часто, в зависимости от целевого локуса, искомая модификация может составлять лишь несколько процентов или даже доли процента, что делает создание клеточных линий и, тем более, использование метода в клинике трудно достижимой задачей. Таким образом, широко применимый метод увеличения уровня модификации с помощью селекции является одной из актуальных задач геномной и клеточной инженерии. Недавно разработанный метод замены аденина на гуанин (A>G) или тимина на цитозин (T>C) в лаборатории проф. Луи, с помощью белковой химеры nCas9-Tad7.10 (ABE7.10) [1], открывает широкие возможности для редактирования геномной ДНК без использования двуцепочечного разрыва и, как результат, без сопровождаемой мутагенной активности. Этот подход особенно привлекателен для использования в клеточной терапии и при создании клеточных моделей с соответствующими заменами. Мы адаптировали метод безмаркерной коселекции, разработанный лабораторией доктора Дойона [2] для редактирования геномной ДНК с помощью редактора оснований ABE, и показали его применимость для получения высокоэффективных A>G и T>C замен. Коселекция с использованием лекарственного средства убаина, ингибитора натрий-калиевого насоса ATP1, помогает увеличивать начальный уровень замен оснований в 10 и более раз. Этот подход позволяет выполнять селекцию клеток без необходимости введения в геном дополнительных селективных маркеров, является высокоэффективным и безопасным методом клеточного клонирования, особенно подходящим при создании линий клеток для применения в клеточной терапии.

Материал и методы.

Клетки, векторы, реагенты и трансфекция. Клетки для работы были получены из ATCC коллекции и содержались при 37°C, в присутствии 5% CO₂ в DMEM среде, фортифицированной 10% бычьей сывороткой,

с антибиотиками. Клетки трансфицировались с помощью Амаха 4D-Nucleofector (Lonza), следуя рекомендациям компании для выбранных клеточных линий. Октогидрат убаина (Sigma) был растворен в горячей воде до концентрации 10 mM и хранился при -20° C. Перед добавлением в среду убаин разводился до 100 мкМ и добавлялся до требуемой концентрации. Вектор для экспрессии ABE получен из Addgene (#107723). Вектора для экспрессии G2 sgRNA (single-guided RNA) и целевых замен получали, как было описано ранее [2].

Селекция и клонирование с использованием убаина. После трансфекции 10⁶ клеток Hek-293T или H1975 1 мкг плазмиды для экспрессии sgRNA для целевого локуса (EGFR) и 0.5 мкг для ATP1A1 вместе с 3 мкг плазмиды, кодирующей ABE7.10, клетки растили 3 дня в обычной среде. Затем в среду добавлялся убаин до 1 мкМ. Клетки селектировали в течение 10 дней, после чего собирали для хранения, генотипирования и клонирования. Клонирование проводили методом лимитированного разведения в 96-луночных планшетах. Полученные пулы клеток и клоны генотипировали секвенированием по Сэнгеру и глубоким секвенированием.

Результаты исследования.

Редактирование ATP1A1 с заменой Q118R приводит к резистентности клеток к 1 мкМ убаину. Для получения клеток с убаин-резистентным натрий-калиевым насосом ATP1 клетки линий Hek-293T или H1975 трансфицировались sgRNA G2 [2] и ABE7.10 для введения A>G в субъединицу ATP1A1 (Q118R). Эта замена делает ATP1 резистентным к микромолярным концентрациям убаина. После начальной 3-х дневной инкубации клеток, в среду добавлялся убаин до 1 мкМ. После 10 дней селекции собирался пул клеток, резистентных к этой концентрации убаина. Секвенирование четвертого экзона ATP1A1 показало 100% замену Q118R.

Коселекция с убаином приводит к многократному увеличению A-G (T-C) замены в комодифицированном локусе на примере терапевтической замены M790T (ATG-ACG) в рецепторе EGF. Для применения коселекции убаин-резистентного насоса ATP1 клетки линии H1975 трансфицировались парой sgRNA: для введения замены M790T в EGFR (последовательность sgRNA: GTGCATGATGAGCTGCACGG) и G2 для введения замены Q118R в субъединицу ATP1A1. После начальной 3-х дневной инкубации клетки разделяли на два пула: один продолжали растить в обычной среде, ко второму добавляли убаин до 1 мкМ. После 10 дней инкубации клетки собирали и генотипировали. Секвенирование четвертого экзона ATP1A1 показало 100% замену Q118R по сравнению с лишь 10±1 % заменой в пуле без селекции. При этом в пуле клеток без селекции замена M790T присутствовала в 5.2±0.5 % аллелей, тогда как в пуле с коселекцией убаином M790T замена содержалась в 55±2.5 % аллелей. Последующее клонирование методом лимитированного разведения подтвердило высокое, около 25 %, содержание клеток с гомозиготной заменой M790T в пуле клеток, резистентных к убаину.

Литература:

1. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees M.S. et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017; 551: 464–71.

2. Aguelo D., Düringer A., Bozoyan L. et al. Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells. *Nat. Methods* 2017; 14: 615–20.

ПД2

L. Fedorov

CRISPR/CAS9 FOR MOUSE GENOME EDITING *IN VIVO*

Oregon Health & Science University, Portland OR, USA

fedorovl@ohsu.edu

Double-stranded DNA breaks (DSB) occasionally occur in cells upon chemical, radiation or other dangerous exposures. On the other hand, generating DSBs via directed gene targeting is a technique for generating models of human hereditary diseases. Presently, CRISPR/Cas9 technology is the most powerful tool for genome editing *in vitro* and *in vivo*. The main components of the CRISPR/Cas9 system are Cas9 endonuclease and guide RNA (gRNA), which together form a ribonucleoprotein (RNP) complex that recognizes desired DNA sequences and completes DSB. To generate mouse models of human hereditary diseases, we injected different modifications of CRISPR/Cas9 complexes into fertilized one cell mouse eggs and compared the targeting efficiency of different approaches. As a result, more than 20 gene knock-out (KO) and knock-in (KI) mouse lines were produced, and more than 60 targeted regions (PAMs) were analyzed. Investigation of the targeted regions demonstrated that frequency of the origin of DSB in PAM regions is variable in different regions of DNA. It seems that this variability depends on both the binding efficiency of individual gRNAs to certain regions of DNA as well as the cleavage efficiency of Cas9. To generate a gene KO by deleting a large fragment of the gene (1–30 kb), we typically select two PAMs for each of two different exons of the gene and use two corresponding gRNAs; this approach leads to 100% CRISPR KO success. DNA sequencing of DSBs after repair revealed that the majority of indels are deletions (1–20 bp) and the rest are insertions (1–6 bp).

To generate CRISPR gene KI, gRNA/Cas9 were injected together with short (100–180 b) single-stranded DNA (ssDNA) or long double-stranded DNA (dsDNA) donors containing corresponding homology sequence to a targeted region. Evaluation of CRISPR KI gene targeting efficiency showed that the CRISPR KI is 3–4 fold less effective than CRISPR KO targeting. Double strand breaks of DNA are repaired by two different mechanisms: homology-driven repair (HDR) and non-homologous end-joining (NHEJ). In the case of CRISPR gene KI, both of these mechanisms appear to participate in DSB repair. Therefore, after CRISPR KI mixture injection into mouse eggs, the groups of founders consist of animals with a variety of modifications of the targeted gene. Participation and competition of NHEJ and HDR pathways in DSB repair in CRISPR KO and KI of genes will be discussed.

ПД3

М.Н. Карагяур^{1,2*}, Д.Т. Дыйканов¹,
К.Ю. Кулебякин^{1,2}, Т.Н. Кочегура¹,
М.В. Шестакова³, И.И. Дедов³, В.А. Ткачук^{1,2,4}

НОВАЯ ИНДУЦИРУЕМАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУ «Эндокринологический научный центр»
МЗ РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии» Минздрава
России, Москва, Россия

M.N. Karagyaour^{1,2*}, D.T. Dyikanov¹,
K.Y. Kulebyakin^{1,2}, T.N. Kochegura¹,
M.V. Shestakova³, I.I. Dedov³, V.A. Tkachuk^{1,2,4}

A NOVEL INDUCIBLE SYSTEM OF EXPRESSION FOR REGULATING THE ACTIVITY OF CRISPR/ CAS9 GENOME EDITING SYSTEM

¹ Institute of Regenerative Medicine, Medical Research
and Education Center, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

³ FGBI «Endocrinology Research Center» MH RF,
Moscow, Russia

⁴ FGBI «National Medical Research Center
of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia,
Moscow, Russia

*m.karagyaour@mail.ru

Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 является уникальным инструментом для прицельного внесения изменений в наследственный материал клетки, что может быть использовано для создания клеточных и животных моделей с целью установления роли отдельных генов или их вариантов в развитии широкого спектра патологий. Однако несмотря на все преимущества система CRISPR/Cas9 обладает определенными недостатками. К основным можно отнести большой размер молекулы программируемой нуклеазы Cas9, что затрудняет ее проникновение через клеточную мембрану (в виде белка или кодирующих его ДНК/РНК), а также недостаточную эффективность и точность ее нуклеазной активности. Эти «особенности» программируемых нуклеаз (в том числе и Cas9) сильно ограничивают их применение в научных исследованиях и в терапевтических целях. Для преодоления существующих ограничений возможно использовать несколько подходов, один из которых подразумевает получение линий клеток или лабораторных животных, несущих кассету, кодирующую программируемую нуклеазу, например, Cas9. Недостатком продолжительного персистирования молекулы Cas9 в клетке является высокая вероятность внесения нежелательных модификаций в геном, что снижает ценность моделей с конститутивной экспрессией программируемых нуклеаз.

В данной работе для обеспечения временно-го контроля экспрессии программируемых нуклеаз

мы предлагаем использовать инновационную систему индукции. Эта система базируется на связывании синтетического белкового транскрипционного фактора (СТФ) со специфичным целевым сайтом ДНК в промоторной области экспрессионной кассеты, кодирующей программируемую нуклеазу. СТФ, созданный на базе малой ферментативно неактивной мегануклеазы, способен обратимо активировать экспрессию гена программируемой нуклеазы, снижая тем самым вероятность нежелательных геномных модификаций. За счет прямого взаимодействия СТФ с целевой последовательностью ДНК в составе промотора отпадает необходимость в дополнительной экспрессии рецептора для индуктора, что является необходимым компонентом системы индукции доксициклином.

Относительно небольшой размер молекулы СТФ (менее 40 кДа) и, соответственно, кодирующей ее РНК/ДНК, позволяет относительно просто доставлять его (при необходимости вместе с направляющей РНК) в составе плазмидных и вирусных конструкций в культуры первичных клеток. Мегануклеаза, послужившая основой для создания СТФ, с высокой точностью распознает сайт ДНК, который не встречается в геномах мыши и человека, что сводит к минимуму возможные нецелевые эффекты, характерные для популярных систем индукции (тамоксифен, экдизон).

Строение молекулы СТФ обеспечивает ее проникновение через интактную клеточную мембрану модифицируемых клеток, что позволяет использовать данный СТФ не только в виде кодирующей его ДНК, но и в белковой форме (добавление в среду культивирования клеток).

Наиболее перспективно выглядит применение данной системы индукции для временного контроля активности программируемых нуклеаз в первичных клетках животных. Полученные однажды линии животных, несущие индуцируемые кассеты экспрессии программируемых нуклеаз, могут стать удобным источником первичных клеток, предназначенных для создания модельных объектов. Добавление к культуре таких клеток СТФ обратимо активирует экспрессию программируемой нуклеазы для внесения перманентных изменений в геном.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ и при поддержке гранта РНФ № 14-35-00026, с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029.

ПД4

**М.Н. Карагяур^{1,2*}, Д.Т. Дыканов¹,
К.Ю. Кулебякин^{1,2}, П.И. Макаревич^{1,2},
А.Ю. Ефименко^{1,2}, Н.А. Александрушкина¹,
В.А. Ткачук^{1,2,3}**

СИСТЕМА РЕКОМБИНИРУЮЩИХ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПРОГРАММИРУЕМЫХ НУКЛЕАЗ В КУЛЬТУРЫ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОК

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

**M.N. Karagyaour^{1,2*}, D.T. Dyikanov¹,
K.Y. Kulebyakin^{1,2}, P.I. Makarevich^{1,2},
A.Y. Efimenko^{1,2}, N.A. Aleksandrushkina¹,
V.A. Tkachuk^{1,2,3}**

A SYSTEM OF RECOMBINABLE LENTIVIRAL PARTICLES FOR THE DELIVERY OF PROGRAMMABLE NUCLEASES TO PRIMARY CELL CULTURES

¹ Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ FGBI «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

*m.karagyaour@mail.ru

Система CRISPR/Cas9 на сегодня является наиболее популярным и удобным инструментом для редактирования генома. Однако, как и другие системы редактирования генома, CRISPR/Cas9 обладает определенными недостатками, одним из которых является большой размер основного компонента системы молекулы Cas9, что затрудняет ее проникновение (будто в виде белка или кодирующих его ДНК/РНК) через мембрану клеток, особенно первичных и плохо подверженных трансфекции. Для клеток животных эту проблему можно преодолеть созданием линии животных, несущих кассеты конститутивной или индуцируемой экспрессии программируемых нуклеаз — чего нельзя сделать для клеток человека. Вирусные способы доставки (лентивирусы), также не способны обеспечить приемлемого уровня модификации (1–2%), поскольку с увеличением размера вирусного генома с 5 до 8.5 тыс. п. о. эффективность сборки лентивирусных частиц, а, соответственно, и эффективность трансдукции падает почти в 100 раз (с 70% до 0.7–1%). При этом размер лентивирусного генома, несущего компоненты системы CRISPR/Cas9 не может быть менее 8.5 тыс. п. о., что сказывается на крайне низком уровне трансдукции даже после концентрирования лентивирусных частиц.

Для улучшения доставки основного компонента системы CRISPR/Cas9 нуклеазы Cas9 в трудно трансфицируемые клетки человека мы предлагаем использовать систему рекомбинирующих лентивирусных частиц. Данная система состоит из трех лентивирусных векторов: первый несет SFFV-промотор, начальный фрагмент гена eCas9 и сайт рекомбинации (loxP-сайт); второй содержит сайт рекомбинации (loxP-сайт), конечный фрагмент гена eCas9 и ген GFP, разделенные t2A-пептидом, терминатор транскрипции (bGHpA); третий несет кассеты экспрессии Cre-рекомбиназы и направляющей РНК. Размер лентивирусного генома каждой из частиц не превышает 6000 п. о., что обеспечивает приемлемый уровень сборки каждой из частиц. Важным является применение при сборке лентивирусных частиц плазмиды, кодирующей мутантную форму интегразы, что позволяет накапливаться ДНК-копиям лентивируса в ядре в эписомальном состоянии. При попадании всех трех частиц в одну клетку Cre-рекомбиназа осуществляет рекомбинацию ДНК-копий лентивирусных частиц, несущих фрагменты Cas9. Особенность строения loxP-сайтов сдвигает равновесие реакции рекомбинации в сторону образования конечного ДНК-продукта SFFV-eCas9#1-loxPmut-eCas9#2-t2A-GFP-bGHpA, поскольку мутантный сайт loxPmut практически

не процессируется Cre-рекомбиназой. loxPmut-сайт в составе гена eCas9 фланкирован донорной и акцепторной последовательностями интрона, что обеспечивает его эффективное выщепление из мРНК eCas9. Неправильный сплайсинг мРНК eCas9 приводит к образованию преждевременного стоп-кодона и отсутствию продукции eCas9 и GFP. Таким образом, полная кассета экспрессии eCas9 и GFP собирается только при условии попадания всех трех лентивирусов в одну клетку с последующей их успешной рекомбинацией. Поскольку ген GFP находится в одной рамке считывания с eCas9, появление экспрессии GFP свидетельствует об успешном сплайсинге мРНК eCas9 и сборке функциональной eCas9. В качестве модельного объекта для тестирования предложенного способа доставки программируемых нуклеаз будут использованы мезенхимные стромальные клетки, трудно модифицируемые другими способами.

Предложенная система рекомбинирующих лентивирусов может быть использована как для доставки кДНК любых программируемых нуклеаз, так и кДНК других крупных белков с целью генной терапии.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 17-04-01452, с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РФФИ № 14-50-00029, и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

ПД5

М.Н. Карагяур^{1,2*}, А.В. Степанова²,
К.Ю. Кулебякин^{1,2}, Д.Т. Дыйканов¹, Т.Н. Кочегура¹,
А.И. Ростовцева², В.А. Ткачук^{1,2,3}

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ КЛЕТОК ASC52TELO, КОНСТИТУТИВНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ПРОГРАММИРУЕМУЮ НУКЛЕАЗУ ESPCAS9

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

M.N. Karagyaour^{1,2*}, A.V. Stepanova²,
K.Y. Kulebyakin^{1,2}, D.T. Dyikanov¹, T.N. Kochegura¹,
A.I. Rostovceva², V.A. Tkachuk^{1,2,3}

CREATION OF THE ASC52TELO CELL LINE CONSTITUTIVELY EXPRESSING THE PROGRAMMABLE NUCLEASE ESPCAS9

¹ Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ FGBI «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

*m.karagyaour@mail.ru

Клеточные культуры являются удобным инструментом моделирования широкого спектра патологических состояний и процессов, особенно с применением

технологий редактирования генома. Популярными линиями трансформированных клеток (HeLa, HEK, 3T3 и др.) могут быть использованы для изучения фундаментальных основ строения и функционирования биологических объектов, однако изучение вклада отдельных генов в возникновение и развитии определенных патологий может быть установлено только на моделях первичных диплоидных клеток. К таким клеткам могут быть отнесены и мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые согласно современным представлениям выполняют широкий спектр физиологических функций и принимают участие в таких патологических процессах, как фиброз, атеросклероз и патологиях, ассоциированных с инсулинорезистентностью и метаболическим синдромом. Помимо этого, продукты секреции МСК могут быть предложены использовать в качестве лекарственного средства. Поэтому крайне удобной представляется возможность направленного выключения/модуляции активности отдельных генов МСК для поиска потенциальных терапевтических мишеней, выявления механизмов развития патологий и улучшения свойств продуктов секреции. Всего этого можно добиться с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9, однако большой размер основного компонента данной системы — нуклеазы SpCas9 (1500 аминокислот) — в совокупности с низкой восприимчивостью МСК к трансфекции препятствуют проведению рутинных исследований. В данной работе нами была использована линия клеток МСК человека ASC52telo. Опробованные нами способы доставки (липофекция, нуклеофекция) позволяли доставлять плазмидную конструкцию, кодирующую компоненты CRISPR/Cas9 (~10 тыс. п. о.), лишь в ~0,1 % популяции клеток линии ASC52telo. Вирусные способы доставки (лентивирусы), также не позволяют добиться приемлемого уровня модификации (менее 1 %), поскольку эффективность сборки лентивирусных частиц, а, соответственно, и эффективность трансдукции находятся в обратной экспоненциальной зависимости от размера лентивирусного генома и составляют ~0,5–5 % при длине генома в 8,5 тыс. п. о. (закодированы компоненты системы CRISPR/Cas9).

Одним из возможных подходов эффективной модификации генома МСК является получение линии МСК, экспрессирующей (конститутивно или после индукции) самый «громоздкий» компонент системы CRISPR — нуклеазу Cas9. В рамках данной работы нами была проведена доставка линейаризованной генетической конструкции, кодирующей высокоточную разновидность нуклеазы eSpCas9 под контролем конститутивного промотора Ef1a, в линию МСК ASC52telo. Интеграция линейаризованной конструкции происходила в произвольную область генома. В одной рамке считывания с eSpCas9 закодирован ген GFP, что позволило отобрать клетки, сохранившие экспрессию GFP в течение более, чем 1 месяца после доставки линейаризованной генетической конструкции. Было получено 7 клонов-кандидатов модифицированных клеток и среди них при помощи RT-PCR было обнаружено 2 клонa, экспрессирующих мРНК Cas9.

При помощи нуклеофекции в один из полученных клонов была доставлена генетическая конструкция (~4 тыс. п. о.), несущая кассеты экспрессии красного флуоресцентного белка TagRFP и направляющей РНК с целью нокаутирования гена PPARγ. Малый размер данной генетической конструкции позволил достичь приемлемого уровня нуклеофекции (>40%). Клетки, экспрессирующие TagRFP были обогащены при помощи клеточной сортировки. Секвенирование ПЦР-ампликонов области

модификации геномной ДНК показало, что около 60% аллелей было расщеплено, в то время как в клетках из группы контроля (без направляющей РНК) область модификации осталась интактной.

Наблюдаемая эффективность доставки генетической конструкции, кодирующей направляющую РНК, и эффективность внесения двуцепочечного разрыва являются достаточными для осуществления knock-in модификаций генома в полученной клеточной линии.

В продолжении работы будет оценена сохранность дифференцировочного потенциала полученного клона ASC52telo-eSpCas9-GFP и будет установлена область интеграции кассеты Ef1a-eSpCas9-t2A-GFP.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ и при поддержке гранта РНФ № 14-35-00026, с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029.

ПДб

**М.Н. Карагяур^{1,2*}, М.С. Казарновский²,
Д.Т. Дыйканов¹, Ю.П. Рубцов³, В.А. Ткачук^{1,2,4}**

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ПРОФИЛАКТИКИ
ИММУННОЙ ЭЛИМИНАЦИИ КЛЕТОК,
ПОДВЕРГШИХСЯ РЕДАКТИРОВАНИЮ
ГЕНОМА ИЛИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

**M.N. Karagyaour^{1,2*}, M.S. Kazarnovskiy²,
D.T. Dyikanov¹, Y.P. Rubtsov³, V.A. Tkachuk^{1,2,4}**

**DEVELOPMENT OF AN APPROACH
TO PREVENT THE IMMUNE ELIMINATION
OF THE CELLS THAT UNDERWENT GENOME
EDITING OR GENE THERAPY**

¹ Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ FGBSI «Institute of Bioorganic Chemistry» of RAS, Moscow, Russia

⁴ FGBI «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

*m.karagyaour@mail.ru

Технологии редактирования генома являются уникальным инструментом для прицельного внесения изменений в наследственный материал клетки, что может быть использовано как в широком спектре исследований биологических объектов, их создания и модификации, так и в медицинских целях с целью коррекции множества генетических патологий. Большинство модификаций генома, проводимых

в терапевтических целях *in vitro* или *in vivo*, предполагают восстановление структуры гена, вызвавшего развитие патологического состояния, что должно привести к продукции функционального белка и восстановлению функции пораженных клеток. Одной из основных проблем терапевтического применения технологий редактирования генома, равно как и генной терапии, является интеграция модифицированных клеток в организм реципиента. Трансплантированные клетки помимо недостаточной трофики испытывают воздействие и иммунной системы реципиента, поскольку они приобрели (восстановили) способность продуцировать функциональный белок, эпитопы которого наряду с эпитопами других белков клетки презентуются на поверхности модифицированной клетки в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости МНСI. Зачастую презентация «новых» эпитопов трансплантированными или модифицированными *in situ* клетками приводит к активации иммунных клеток и элиминации первых, поскольку «новые» эпитопы (в случае генетической патологии) не были представлены в тимусе (или костном мозге) в момент отрицательной селекции иммунных клеток. В качестве «новых» эпитопов могут выступать и фрагменты молекул нуклеаз, применяемых для редактирования генома (например, Cas9), поскольку они представляют собой белки бактериального происхождения. В мировой литературе встречаются данные о существовании иммунитета, направленного против эпитопов Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpCas9).

Для избирательного подавления иммунного ответа, направленного против определенных эпитопов, в рамках данной работы мы предлагаем использовать принудительную конверсию Т-хелперных лимфоцитов, специфичных к упомянутым эпитопам, в Т-регуляторные клетки, обеспечивающие природную толерантность иммунной системы к эпитопам собственных клеток и микробиоты. В качестве модельной системы будет вырабатываться толерантность к эпитопам широко применяемой нуклеазы SpCas9. С этой целью из периферической крови будут выделены моноклеарные клетки, из популяции которых путем сокультивирования *in vitro* с клетками (линейные клетки мыши или первичные мезенхимные стромальные клетки мыши), экспрессирующими нуклеазу SpCas9, и последующей клеточной сортировки будут отобраны активировавшиеся Т-хелперные лимфоциты. Последние при помощи векторных конструкций, кодирующих фактор транскрипции FOXP3, будут принудительно переведены в состояние Т-регуляторов. Способность полученных Т-регуляторных клеток избирательно подавлять иммунную систему в отношении эпитопов SpCas9 и клеток их экспонирующих будет протестирована *in vitro* и *in vivo* (мышь).

Предложенный подход может быть использован для избирательного подавления иммунитета, направленного против эпитопов вирусных капсидов с целью профилактики иммунной элиминации генно-модифицированных вирусами клеток или для снижения клинических проявлений аутоиммунных заболеваний различной этиологии, в том числе, обусловленных несовершенством отрицательной селекции Т- и В-лимфоцитов.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 18-015-00535, с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029, и с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

ПД7

М.И. Котлов, Д.К. Армянинова, Д.С. Карпов*
РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
СИСТЕМ CRISPR/CAS ДЛЯ
РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ

ФГБУН Институт молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Россия

M.I. Kotlov, D.K. Armyaninova, D.S. Karpov*
DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT
OF CRISPR/CAS9 SYSTEMS FOR YEAST
GENOME EDITING

Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia

*aleom@yandex.ru

Введение. Дрожжи — это многочисленная группа одноклеточных грибов, размножающихся преимущественно вегетативно. Дрожжи используются как продуценты этанола и других органических веществ, витаминов, ферментов, фармацевтических белков и т.д. Некоторые представители рода *Candida* патогенны для человека. В целях детального исследования физиологических процессов дрожжевых клеток для получения новых штаммов продуцентов, создания новых лекарственных средств против патогенных штаммов разрабатываются новые инструменты генной и геномной инженерии дрожжей. Одним из таких инструментов стала система CRISPR/Cas9 из бактерий *Streptococcus pyogenes*. С помощью этой системы повысилась эффективность внесения изменений в геном дрожжей, а также расширился набор вносимых изменений. Система CRISPR/Cas9 адаптирована к редактированию геномов различных видов дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe* и других [1]. При разработке системы CRISPR/Cas9 для редактирования данного вида дрожжей учитываются особенности его генетического кода, частота использования кодонов, отбираются наиболее сильные промоторы для высокой экспрессии компонентов системы. Выбираются способы искусственного процессинга химерного транскрипта, состоящего из нескольких направляющих РНК. Отдельное внимание уделяется контролю активностей клеточных систем репарации ДНК, чтобы повысить эффективность внесения интересующего типа изменения в геном.

Debaryomyces hansenii — это непатогенные осмо- и галотолерантные дрожжи класса *Saccharomycetes*, часто выделяемые из морской воды и других сред обитания с высокой соленостью. В фундаментальных исследованиях *D.hansenii* служит моделью при изучении молекулярных механизмов гало- и осмотолерантности, в биотехнологии он имеет большое значение в пищевой промышленности как компонент стартовых культур при изготовлении колбасных изделий и сыров [2]. В настоящее время отсутствуют какие-либо эффективные молекулярные инструменты для манипуляции с геномом *D. hansenii*, что серьезно ограничивает его фундаментальные исследования и реализацию биотехнологического потенциала. Цель настоящей работы — разработать эффективную CRISPR/Cas9 систему редактирования генома *D. hansenii*.

Материал и методы. Использовали штамм DBH9 и плазмиду pDH4 (любезно предоставлены проф. Alok K. Mondal). Плазмиду pDhCRISPR, кодирующую полную систему CRISPR/Cas9, получали модифицированным нами методом рекомбинационного клонирования в дрожжах [3]. Правильность сборки плазмид подтверждали с помощью ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования. Спейсеры против гена DEHA2G13772g, похожего на ген *ADE2 S. cerevisiae*, получили путем отжига комплементарных нуклеотидов и клонировали в pDhCRISPR по сайтам BbsI. Плазмидами с активированной системой CRISPR/Cas9 трансформировали штамм DBH9 методом электропорации [4] и растили на селективной среде без гистидина с низкой концентрацией аденина (2 мкг/мл). Из колоний, окрашенных в розовый/красный цвет, выделяли геномную ДНК. Участки DEHA2G13772g, содержащие мишени CRISPR/Cas9, амплифицировали и анализировали на присутствие инделов с помощью эндонуклеазы I фага T7. Результаты подтверждали секвенированием ПЦР-продуктов.

Результаты исследования. В первой версии системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *D.hansenii*, SpyCas9 экспрессировался под контролем промотора pDhGPD1, а направляющая РНК под контролем промотора pDhSCR1, транскрибируемого РНК-полимеразой III. Следует отметить, что у гена SpyCas9 кодоны CTG заменены на CTT, чтобы учесть отличия в генетическом коде *D. hansenii*. Эта версия обеспечивала эффективность редактирования модельного гена DEHA2G13772g, похожего на ген *ADE2 S. cerevisiae* 0,5–2,1%. Мы провели оптимизацию промотора для экспрессии гена SpyCas9 и получили систему, где ген SpyCas9 экспрессировался под контролем промотора pDhTEF1. Улучшенная версия CRISPR/Cas9 системы обеспечивала эффективность редактирования гена DEHA2G13772g 45–95% в зависимости от последовательности направляющей РНК. Можно отметить, что редактируемые штаммы *D. hansenii* характеризуются низкой скоростью роста и окраской колоний в розовый и(или) красный цвет, свидетельствующей о нарушении метаболизма аденина. Следует отметить, что модифицированный штамм *D. hansenii*, в отличие от аналогичного штамма *S. cerevisiae* не способен расти на среде при полном отсутствии аденина.

Обсуждение. Эффективность работы первой версии системы CRISPR/Cas9 для *D. hansenii* сходна с активностью системы CRISPR/Cas9, разработанной для *Candida albicans*, но использованной в родственном виде *Candida famata* [5]. Путем оптимизации промотора SpyCas9 нами получена высокоэффективная система, позволяющая редактировать геном *D. hansenii* с эффективностью до 95%. Следует отметить, что выживаемость штаммов понижена после трансформации высокоэффективной системой, что может быть связано со слабой активностью систем репарации ДНК у *D. hansenii* [6]. Дальнейшее усовершенствование системы редактирования генома *D. hansenii* может быть реализовано за счет использования гетерологичных систем репарации ДНК или восстановления активности некоторых генов собственных систем репарации *D. hansenii*.

Выводы.

1. Впервые получена эффективная CRISPR/Cas9 система для редактирования генома *D. hansenii*.
2. Впервые получены указания на участие фермента, кодируемого DEHA2G13772g, в биосинтезе аденина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-07021 и программы

фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (№ 01201363823).

Литература:

1. Raschmanová H., Weninger A., Glieder A. et al. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol Adv.* 2018; S0734-9750(18): 30006–5.
2. Yaguchi A., Rives D., Blenner M. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance. *AIMS Microbiology* 2017; 3(2): 227–47.
3. Армянинова Д.К., Карпов Д.С. Модификация гена SpCas9 для усовершенствования CRISPR/Cas9 системы редактирования генома. Биотехнология: состояние и перспективы развития: тезисы IX международного конгресса, 2017; 2: 376–9.
4. Minhas A., Biswas D., Mondal A.K. Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9: 95–102.
5. Lyzak O., Dmytruk K., Sibirny A. Generation of mutations in ADE2 gene using a CRISPR-Cas9 system in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology* 2016; 73: 154–9.
6. Richard G.F., Kerrest A., Lafontaine I. et al. Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Mol. Biol. Evol.* 2005; 22(4): 1011–23.

ПД8

О.И. Лаврик

РЕПАРАЦИЯ ДНК — КЛЮЧЕВОЙ МЕХАНИЗМ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

O.I. Lavrik

DNA REPAIR — A KEY MECHANISM TO MAINTAIN GENOME STABILITY

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

lavrik@niboch.nsc.ru

Ансамбли белков, осуществляющие репарацию ДНК, играют ключевую роль в сохранении генетической информации, поскольку различные факторы окружающей среды, а также агенты эндогенного происхождения постоянно повреждают структуру ДНК. К таким воздействиям относятся ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, эндогенные окислители, а также продукты, загрязняющие окружающую среду. Редактирование геномов с помощью CRISPR/Cas9, в процессе которого создаются разрывы в ДНК, также можно отнести к ДНК-повреждающим факторам, а образующиеся разрывы ДНК могут быть объектами воздействия систем репарации. В процессе эволюции возникло несколько эффективных специализированных систем, которые способны исправить любые повреждения в структуре ДНК. Неисправности в работе систем репарации ДНК приводят к появлению мутаций и, как следствие, вызывают тяжелые заболевания человека, в том числе являются причиной возникновения рака, нейродегенеративных заболеваний и старения. Исследование механизмов репарации необходимо для поиска наиболее оптимальных путей лечения нейродегенеративных и онкозаболеваний

человека, а также минимизации побочных действий применения технологии CRISPR/Cas9.

В докладе будут представлены результаты исследований структурно-функциональной организации систем репарации человека [1, 2], а также по разработке новых протеомных методов для идентификации в экстрактах клеток новых белковых факторов и ферментов, участвующих в ключевых процессах репарации ДНК. Для этой цели в качестве подхода был применен метод аффинной модификации в сочетании со спектроскопией MALDI-MS [3]. С помощью разработанных оригинальных подходов был обнаружен ряд белков (поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 и 2 (PARP1/2), HMGB1, Ku70/80, YB-1, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза1), взаимодействующих с ДНК, содержащими AP-сайты и разрывы [4, 5]. Это взаимодействие обеспечивает временную защиту повреждений ДНК, а также регуляцию их последующей репарации. Обнаруженные белковые факторы являются маркерами чувствительности клеток к ионизирующему излучению, поэтому разработанные подходы позволяют оценивать эффективность систем репарации ДНК в клетках, и, следовательно, их устойчивость к ДНК-повреждающим факторам.

Разрывы ДНК, в том числе вносимые Cas9, являются сигналом для активации синтеза поли(АДФ-рибозы), катализируемого PARP1/2, а также для взаимодействия с этими разрывами других клеточных ник-сенсоров. В докладе будет рассмотрена роль PARP1 и PARP2 в регуляции процессов репарации ДНК и взаимодействие этих белков со структурами ДНК, несущими повреждения, исправляемые различными системами репарации [6, 7]. Будет рассмотрена роль взаимодействия PARP1 и PARP2 с белками систем репарации ДНК, а также новые белковые мишени поли (АДФ-рибозил)ирования. Ключевая роль PARP1 в регуляции процессов метаболизма ДНК позволила создать препараты для лечения онкозаболеваний на основе ингибиторов этого фермента. В докладе будут представлены данные о роли CRISPR/Cas9 в установлении механизмов действия клинических онкопрепаратов — ингибиторов PARP1.

Работа поддержана грантами РФФИ (14-24-00038) и РФФИ (17-04-00925).

Литература:

1. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O. et al. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(12): 6009–22.
2. Moor N.A., Lavrik O.I. Protein-protein interactions in DNA base excision repair. *Biochemistry (Mosc.)* 2018; 83(4): 411–22.
3. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. New players in recognition of intact and cleaved AP sites: Implication in DNA repair in mammalian cells, in *Selected Topics in DNA repair 2011*. INTECH, Croatia, Ed. C.C. Chen.: 305–30.
4. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S. et al. Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107(51): 22090–5.
5. Kosova A.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Ku antigen displays the AP lyase activity on a certain type of duplex DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1864(9): 1244–52.
6. Sukhanova M.V., Abrakhi S., Joshi V.V. et al. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(6): e60.
7. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Sukhanova M.V. et al. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.* 2015; 290(36): 21811–20.

ПД9

С.П. Медведев^{1, 2, 3, 4*}, В.Р. Коваленко^{1, 2, 3, 4},
С.М. Закиян^{1, 2, 3, 4}

ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR-ОПОСРЕДОВАННЫХ СИСТЕМ И ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

S.P. Medvedev^{1, 2, 3, 4*}, V.R. Kovalenko^{1, 2, 3, 4},
S.M. Zakian^{1, 2, 3, 4}

APPLICATION OF CRISPR-MEDIATED SYSTEMS AND GENETICALLY ENCODED BIOSENSORS FOR THE CREATION AND INVESTIGATION OF CELLULAR MODELS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

¹ Federal Research Centre Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Centre, Ministry of Health Care of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*medvedev@bionet.nsc.ru

Нейродегенеративные заболевания занимают значительную долю в структуре заболеваемости по всему миру. В частности, в связи с увеличением среднего возраста населения в большинстве развитых стран, резко возрастает доля пациентов с такими диагнозами, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Многочисленные исследования пока не привели к появлению препаратов, которые могут достаточно эффективно и безопасно применяться в терапии этих и многих других нейродегенеративных заболеваний. Во многом эти проблемы связаны с недостаточным пониманием молекулярно-генетических механизмов, которые лежат в основе патогенеза, а также с отсутствием моделей, позволяющих получать не только качественные, но и количественные данные о процессах, происходящих в нейронах пациентов. Прогресс в области создания и применения CRISPR-опосредованных систем открывает широкие перспективы их применения для изучения полигенных нейродегенеративных заболеваний, например, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или боковой амиотрофический склероз. При исследовании клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний данные системы редактирования можно использовать в следующих направлениях:

- 1) нокаут генов для поиска тех из них, которые задействованы в патогенезе заболеваний напрямую или модифицируют его;
- 2) создание изогенных клеточных моделей;

- 3) создание трансгенных клеточных линий, которые предназначены для мониторинга направленной дифференцировки в релевантные типы нейронов, а также получения качественных и количественных данных о происходящих в клетках патологических процессах (апоптоз, окислительный стресс, дисфункция эндоплазматического ретикулаума).

Современная наука обладает достаточно обширным арсеналом методов и инструментов для изучения клеток в культуре и в организмах животных и человека. Однако большинство из этих методик инвазивны и требуют фиксации или разрушения клетки, что существенно усложняется задачу исследования процессов, распределенных в пространстве и во времени. Использование генетически кодируемых биосенсоров позволяет решить данную проблему и исследовать динамику событий, происходящих в живой клетке в реальном времени. Кроме того, совместное использование технологии создания моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и биосенсоров, позволяет исследовать молекулярно-генетические механизмы болезней на релевантных типах клеток пациентов, в частности, на различных типах нейронов. В докладе будет дан обзор вариантов использования CRISPR-опосредованных систем и генетически кодируемых биосенсоров для исследования апоптоза, дисфункции эндоплазматического ретикулаума и окислительно-восстановительных процессов. Помимо этого, будет обсуждена возможность совместного применения биосенсоров, систем направленного редактирования нуклеотидных последовательностей и изучения белок-белковых взаимодействий для комплексного исследования патогенеза нейродегенеративных болезней и поиска мишеней для их терапии.

Работа финансируется в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий», проект № 0324-2018-0042.

ПД10

B. Skryabin*, T. Rozhdestvensky, L.V. Gubar,
B. Seeger, H. Kaiser, A. Stegemann

WHAT KIND OF MOUSE MODEL DO YOU NEED? USING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR MOUSE GENOME MODIFICATION

Transgenic animal and genetic engineering Models (TRAM), Faculty of Medicine of the Westfalian Wilhelms-University, Muenster, Germany

*skryabi@uni-muenster.de

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) system for editing genomes of various organisms was introduced in 2012 and revolutionised research in modern biology and medicine. The CRISPR/cas9 technology has borrowed the defense system of the *Streptococcus pyogenes* and deliver the codon optimized endonuclease Cas9 to specific target site of most genomes with help of short programmable RNA molecule. The creation of specific nuclease for almost any region of DNA using CRISPR, unlike ZFN and TALEN systems, relatively easy and demonstrates high efficiency. TRAM (TRANsgenic animal and genetic engineering Models) group of the medical faculty of the University of Münster (Germany) uses the CRISPR/cas9 system in daily work to create new lines of different kind transgenic mice. Among them the classical and conditional gene knock-out, knock-in at specific mouse loci, and introduction of point mutation or epitope in desired

gene regions. The efficiency of gene modification at specific locus using the NHEJ mechanism reaches almost 90%, and the efficiency of targeted edition using the HDR mechanism is up to 50%. We will present data on the selection of the target, gRNA (crRNA) design, selection of effective nucleases, characteristics of modified loci and methods of microinjection of CRISPR/cas9 components in murine oocytes.

ПД11

S. Svitashhev

**PRECISION PLANT BREEDING USING
CRISPR-CAS9 TECHNOLOGY**

*Corteva Agriscience — Agriculture Division
of DowDuPont, Johnston, IA, USA*

sergei.svitashhev@pioneer.com

CRISPR-Cas is a powerful DSB technology and has a wide-ranging application in plant breeding programs.

The ability to direct sequence variation using CRISPR-Cas system, combined with low-cost genome sequencing and advances in plant transformation of elite germplasm, represents a targeted breeding approach envisioned and put to work at Corteva Agriscience.

Currently, plant transformation primarily relies on *Agrobacterium*- and biolistic-mediated delivery of CRISPR-Cas9 reagents on DNA vectors. To expand our options and increase precision and specificity of this technology, we developed an alternative method of delivering Cas9 and guide RNA (gRNA) into plant cells in the form of ribonucleoprotein (RNP). We demonstrated that Cas9-gRNA RNP complexes can be delivered biolisticly into maize embryo cells and facilitate both gene mutagenesis and gene editing with frequencies exceeding those observed in DNA vector delivery experiments. Using this approach, we demonstrated completely DNA- and selectable marker-free gene mutagenesis in maize and recovery of plants with mutated alleles with high frequencies. These results open new opportunities for precision breeding in a wide variety of crop species.

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

УД1

А.А. Анучина¹, С.А. Смирнихина¹, А.В. Лавров^{1,2}**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕПАРАЦИИ ПРИ ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9**¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», лаборатория мутагенеза, Москва, Россия² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, РоссияA.A. Anuchina¹, S.A. Smirnikhina¹, A.V. Lavrov^{1,2}**INCREASING HOMOLOGY-DIRECTED REPAIR EFFICIENCY DURING GENOME EDITING WITH CRISPR-CAS9**¹ FSBI "Research Centre for Medical Genetics", 115522, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

arinate@mail.ru

На сегодняшний день одним из самых эффективных способов геномной терапии является использование системы геномного редактирования бактерий — CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Для улучшения работы системы применяется ряд различных методов, в числе которых изменение экспрессии факторов выбора путей репарации ДНК. В данной работе будет впервые использован новейший фактор контроля путей репарации, TIRR, который ранее не применялся для стимуляции редактирования генов.

Работа системы CRISPR-Cas9 основана на механизме негомологичного соединения концов (НГСК) для инактивации гена и на направленной гомологичной репарации (ГР) — для активации. В последнем случае проблемой является низкая эффективность ГР в клетках вследствие доминирования механизма НГСК. Сегодня одной из ключевых проблем при активации гена является нахождение способа повысить эффективность ГР. Регуляция выбора пути репарации может осуществляться с помощью различных факторов, которых сегодня обнаружено большое количество: это могут быть белки контрольных точек клетки, киназы, хроматиновые модификаторы, гистон-маскирующие белки и многие другие [1–4]. Одним из недавно открытых факторов является белок TIRR (Tudor Interacting DNA Repair Regulator), взаимодействующий с одним из главных факторов классического НГСК — 53BP1 (p53-binding protein 1) и достоверно повышающий число образующихся фокусов гомологичной рекомбинации. Целью данной работы является изучение возможностей улучшения гомологичной рекомбинации с помощью белка TIRR.

Для оценки роли TIRR в активации ГР в модельной культуре клеток HEK293T проводится редактирование гена *GFP* с помощью системы CRISPR-Cas9. Изначально нокаутированный *GFP* восстанавливает функцию при ГР с вводимой матрицей ДНК. Увеличение экспрессии гена *NUDT16L*, кодирующего TIRR достигается путём

ко-трансфекции в клетки плазмиды с данным геном, а его нокаут добавлением в среду культивирования малых интерферирующих РНК. Оценка эффективности НГСК и ГР проводится с помощью секвенирования с последующим анализом TIDE и с помощью анализа T7E1. Помимо этого эффективность ГР оценивается по появлению флуоресценции GFP.

TIRR, до недавнего времени считавшийся неохарактеризованным белком, был описан как регулятор привлечения 53BP1 к хроматину. Взаимодействие TIRR с 53BP1 обусловлено способностью белка маскировать гистон-связывающий мотив, с которым 53BP1 взаимодействует через **домен Tudor**. В норме он находится в комплексе с 53BP1, однако при возникновении ДНР фосфорилирование S/TQ сайтов 53BP1 обеспечивает его соединение с RIF1 и диссоциацию комплекса TIRR/53BP1 [5]. Интересно, что как гиперэкспрессия, так и ингибирование TIRR стимулируют направленную гомологичную репарацию, следовательно, клетке необходимо поддерживать некий конститутивный уровень белка, и любое его изменение сказывается на работе НГСК [1]. Будущая работа с использованием плазмид для гиперэкспрессии и супрессией гена *TIRR* должна, помимо прочего, помочь исследовать функциональные свойства этого фактора.

Литература:

1. Drané P., Chowdhury D. TIRR and 53BP1- partners in arms. *Cell Cycle* 2017; 16(13): 1235–6.
2. Simonetta M., de Krijger I., Serrat J. et al. H4K20me2 distinguishes pre-replicative from post-replicative chromatin to appropriately direct DNA repair pathway choice by 53BP1-RIF1-MAD2L2. *Cell Cycle* 2017; 4101: 1–13.
3. Uranga L.A., Reyes E.D., Patidar P.L. et al. The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Commun.* 2017; 8: 1–11.
4. Brandt D.T., Baarlink C., Kitzing T.M. et al. SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of β 1-integrin. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11: 557–68.
5. Drané P., Brault M.E., Cui G. et al. TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function. *Nature* 2017; 543: 211–6.

УД2

А.А. Атемасова¹, Е.В. Лопатухина^{1,2},
А.А. Зотова^{1,2}, Д.В. Мазуров²

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОКАУТНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ НОКИНА GPI-ЗАЯКОРЕННЫХ ЭПИТОПНЫХ ТАГОВ

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, Москва, Россия
² ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук», Группа клеточных и генных технологий, Москва, Россия

A. Atemasova¹, E. Lopatukhina^{1,2}, A. Zotova^{1,2},
D. Mazurov²

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF KNOCKOUT CELLS GENERATED VIA KNOCKIN OF GPI-ANCHORED EPI TOPE TAGS

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia
² Institute of Gene Biology RAS, Cell and Gene Technology Group, Moscow, Russia

justatemasova@gmail.com

Введение. Для технологий редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 свойственна проблема off-target эффектов, т.е. разрезание ДНК вне целевого гена, что приводит к нарушению работы других генов, в том числе важных для функционирования клеток. В связи с этим полученные клеточные нокауты должны быть охарактеризованы генетически и функционально перед изучением специфических функций целевого гена.

Ранее мы показали, что изолирование отредактированных клеток в виде поликлональной популяции имеет преимущество перед клонированием по скорости роста и некоторым функциональным показателям [1]. В настоящей работе мы проанализировали функциональные свойства отредактированных клеток, полученных методом сортировки с использованием новых маркерных эпитопов, экспрессирующихся на поверхности клетки в контексте GPI-белка CD52 и сравнили их со свойствами клонов, выращенных после обработки CRISPR/Cas9. Функциональность оценивали по репликации ретровирусов человека HIV-1 и HTLV-1, сильно зависящей от клеточных факторов репликации.

Материал и методы. Для получения поликлональных нокаутных клеток использовали недавно разработанный метод, заключающийся в том, что в целевой ген в результате котрансфекции компонентов CRISPR/Cas9 и донорской ДНК производили нокин короткой оригинальной конструкции на основе GPI-белка CD52 со встроенным эпитопным тагом Flag или HA. Через 3–5 дней клетки окрашивали антителами к эпитопам, анализировали на проточном цитофлюориметре и сортировали на приборе FACS Aria II. Альтернативно, селекцию нокаутных клеток проводили после клонирования трансфицированных клеток по одной в лунку. Эффективность нокаута гена-мишени оценивали методом иммуноблоттинга. Функциональность клеток оценивали по уровню репликации двух ретровирусов человека: HIV-1 и HTLV-1 — на клетках HEK 2392T в одноэтапном тесте трансфекции/инфекции с усовершенствованным интрон-содержащим репортерным вектором inLuc-mR, опубликованном ранее [2,

3]. Уровень инфекции измеряли по активности люциферазы через 48–50 ч от начала трансфекции.

Результаты исследования. Вестерн-блот анализ клеток, выделенных в результате сортировки клеток по одному из маркеров, показал, что целевой белок либо не детектируется, либо, определяется в малых количествах. При сортировке по двум меткам, получались полные нокауты как по гену VDAC1, так и VDAC3. Процент клеток, которые экспрессировали две метки одновременно, составлял 0,4–1% на третий день после трансфекции. В результате 2–3 раундов сортировки популяция обогащалась свыше 98%. При скрининге клонов в иммуноблоте 3 из 16 тестируемых образцов оказались нокаутными по VDAC1 (18,8%), и 1 из 19 — по VDAC3 (5,3%). Уровни репликации вирусов HIV-1 и HTLV-1 в клетках, нокаутных по VDAC1 и VDAC3, полученных в результате сортировки по двум эпитопным тагам, не отличались от уровней репликации данных вирусов в родительских клетках. Среди же моноклональных клеток, нокаутных по VDAC1, два клона из трёх в инфекционном тесте показали примерно на один порядок меньший уровень репликации HIV-1 ($p < 0,034$ и $p < 0,021$) и HTLV-1 ($p < 0,05$ и $p < 0,034$) по сравнению с родительской клеточной линией.

Обсуждение. Несмотря на невысокую эффективность нокина в оба аллеля (0,4–1%), сортировка позволяет быстро получить популяцию с полным нокаутом гена, тогда как метод традиционного клонирования оказывается довольно трудоемким в поиске нокаутов. Кроме того, среди моноклонов наблюдаются большие вариации в уровнях репликации вирусов HIV-1 и HTLV-1, вероятно, потому, что внеаргетные мутации генома наследуются и косвенно оказывают влияние на репликацию вируса. В тоже время в поликлональной популяции, где не наблюдались изменения в инфекционных тестах, напротив, клетки с минимальными off-target эффектами, возможно, конкурируют с клетками, унаследовавшими серьезные повреждения генома, и вытесняют их.

Выводы. Разработанный новый метод селекции отредактированных клеток позволяет получить популяцию нокаутов, более релевантную для последующих функциональных тестов, чем нокауты, полученные клонированием, и с меньшими трудозатратами. Дальнейшее изучение свойств этих клеток требуется для более полной их характеристики.

Литература:

1. Zotova A., Lopatukhina E., Filatov A. et al. Gene editing in human lymphoid cells: role for donor dna, type of genomic nuclease and cell selection method. *Viruses* 2017; 9(11): E325.
2. Shunaeva A., Potashnikova D., Pichugin A. et al. Improvement of HIV-1 and human T cell lymphotropic virus type 1 replication-dependent vectors via optimization of reporter gene reconstitution and modification with intronic short hairpin RNA. *J. Virol.* 2015; 89(20): 10591–601.
3. Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G. et al. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2): e1000788.

УДЗ

К.Р. Валетдинова^{1, 2, 3, 4}, В.С. Овечкина^{1, 2, 4},
С.М. Закиян^{1, 2, 3, 4}

РЕДАКТИРОВАНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЗАМЕНЫ С.840 С>Т В 7 ЭКЗОНЕ ГЕНА SMN2 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СПОСОБ КОРРЕКЦИИ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

¹ ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина», Новосибирск, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

K.R. Valetdinova^{1, 2, 3, 4*}, V.S. Ovechkina^{1, 2, 4},
S.M. Zakian^{1, 2, 3, 4}

EDITING A SILENT MUTATION IN EXON 7 (C. 840 C>T) OF SMN2 AS A POTENTIAL APPROACH TO CORRECT SPINAL MUSCULAR ATROPHY

¹ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

³ Siberian Federal Biomedical Research Center E.N. Meshalkin, Novosibirsk, Russia

⁴ National Research University Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

kamila23@list.ru

Введение. Однонуклеотидные замены в кодирующих участках генов являются распространенной причиной многих наследственных заболеваний. В случае спинальной мышечной атрофии (СМА) замена с.840 С>Т в 7 экзоне гена *SMN2* приводит к нарушению сплайсинга и вырезанию данного экзона из большей части (от 80 до 90%) транскриптов. Коррекция сплайсинга путем обратной замены Т→С в 7 экзоне гена *SMN2* является перспективным подходом для разработки методов лечения данного заболевания.

Материал и методы. Система, включающая в себя векторные конструкции, экспрессирующие компоненты CRISPR/Cas9, и донорные векторы были получены с помощью стандартных методов молекулярного клонирования. Дизайн всех конструкций были разработан с помощью программного обеспечения Benchling и SnapGene. Эффективность работы созданных векторных конструкций оценивалась путем доставки плазмид в клетки, полученные от пациента со СМА I типа, имеющего гомозиготную делецию *SMN1* и 2 копии гена *SMN2*, с помощью Neon Transfection System. Эффективность внесения двуцепочечных разрывов была проанализирована с помощью программного обеспечения TIDE.

Результаты исследования. На основании биоинформатического анализа было выбрано три потенциальных мишени (CRISPR_T1-3) в пределах 7 экзона гена *SMN2* для системы CRISPR/Cas9. Основным условием выбора протоспейсеров была локализация в непосредственной близости от замены с.840 С>Т. Сравнительный анализ средней эффективности работы систем CRISPR/Cas9 в разных

типах клеток не выявил значимых различий между значениями ($p=0,097$). Однако при попарном сравнении каждой группы можно наблюдать тенденцию к понижению эффективности работы системы в пределах целевого участка гена *SMN2* в предшественниках моторных нейронов линии iSMA6L по сравнению с работой системы в фибробластах линии f1SMA ($p=0,068$) и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках линии iSMA6L ($p=0,068$). В культуре фибробластов наблюдается тенденция к увеличению эффективности работы системы CRISPR_T2 относительно остальных ($p=0,68$). При анализе нецелевых эффектов с помощью программного обеспечения COSMID, Cas-OFFinder и GT-SCAN было показано, что наименьшее количество потенциальных нецелевых сайтов имеет протоспейсер T1, наибольшее — T3.

Обсуждение. Низкая целевая активность CRISPR/Cas9 в предшественниках моторных нейронов может быть обусловлена тем, что большинство мутаций, появившихся после рекомбинации путем воссоединения негомологичных концов, снижают жизнеспособность клеток. Поскольку в отсутствие нормальной копии генов *SMN1/SMN2* клетки погибают [1], выживают только те из них, в которых изменения произошли в одном аллеле гена *SMN2*, либо репарация двуцепочечных разрывов произошла без ошибок. Кроме того, важным моментом, оказывающим непосредственное влияние на снижение целевой активности, является форма доставки компонентов системы CRISPR/Cas9. Последние данные убедительно показывают, что доставка в виде РНК-белковых комплексов (sgRNA-Cas9) имеет значительное преимущество перед доставкой в форме ДНК. Она обеспечивает близкую к 100% эффективность внесения инсерций/делеций, большую выживаемость субклонов, практически полное отсутствие нецелевых эффектов [2].

Выводы. Получена двухкомпонентная система, состоящая из трех плазмидных векторов, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, предназначенных для внесения двуцепочечных разрывов в 7 экзон гена *SMN2*, и донорной плазмиды. По результатам анализа целевой и нецелевой активности для дальнейшей работы по коррекции замены с.840 С>Т в 7 экзоне гена *SMN2* был выбран протоспейсер CRISPR_T2.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 17-75-10041.

Литература:

1. Nurputra D.K., Lai P.S., Harahap N.I. et al. Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials. *Ann. Hum. Genet.* 2013; 77: 435–63.
2. Liang X., Potter J., Kumar S. et al. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J. Biotechnol.* 2017; 241: 136–46.

УД4

А.С. Ветчинова¹, Е.Ю. Федотова¹,
Н.Ю. Абрамычева¹, Е.В. Новосадова²,
И.А. Гривенников², С.Н. Иллариошкин¹

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR/ CAS9 В ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

¹ ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН,
Москва, Россия

A.S. Vetchinova¹, E.Yu. Fedotova¹,
N.Yu. Abramychyeva¹, E.V. Novosadova²,
I.A. Grivennikov², S.N. Illarioshkin¹

CRISPR/CAS9 GENOME EDITING IN THE STUDIES OF CELL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

² Institute of Molecular Genetics of the Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia

annvet@mail.ru

Введение. Одним из распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), в развитии которой большая роль принадлежит генетическим факторам [1]. БП — возраст зависимое заболевание, и в связи с неуклонным увеличением доли пожилых лиц в структуре современного общества придает БП высокую социальную значимость [2]. Существующие методы лечения БП носят главным образом симптоматический характер и не предотвращают прогрессирования текущего нейродегенеративного процесса [3]. Растущую роль в современной нейробиологии играют новые высокотехнологичные подходы к моделированию нейродегенеративных заболеваний человека. Среди них — направленное геномное редактирование с помощью программируемых нуклеаз (CRISPR/CAS9 и др.), позволяющее осуществлять коррекцию генетических дефектов на уровне клеток. Особенно перспективным представляется применение технологии геномного редактирования на специализированных нейронах и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), получаемых от больных с наследственными формами нейродегенерации в результате клеточного репрограммирования [4]. В данной статье обобщен собственный опыт, связанный с возможностью редактирования генома клеток ИПСК, полученных из фибробластов больных, страдающих разными наследственными формами БП, ассоциированных с мутациями в генах *PARK2* и *LRRK2*. На экспериментальной модели паркинсонизма у крыс мы попытались оценить влияние процедуры геномного редактирования на эффективность трансплантации в стриатум нейрональных предшественников, полученных от пациента с генетической формой БП.

Материал и методы. Для исследования были отобраны две культуры ИПСК, полученные в результате генетического репрограммирования фибробластов пациента с аутосомно-доминантной формой БП, ассоциированной с геном *LRRK2* (форма *PARK8*), а также из фибробластов пациента с аутосомно-рецессивной формой БП — носителя компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *PARK2*. Коррекция мутации G2019S в гене *LRRK2* и мутации (del202-203AG) и (IVS1+1G/A) в гене *PARK 2* в культуре

ИПСК осуществлялась с использованием искусственной нуклеазной системы CRISPR/Cas9.

Паркинсонический синдром моделировали у крыс линии Wistar (n=24) путем одностороннего введения в черную субстанцию мозга селективного нейротоксина 6-гидроксидофамина, избирательно повреждающего дофаминергические нейроны. Нейрональные предшественники дифференцировали из ИПСК, полученных от пациента с *PARK8*-формой БП — носителя мутации G2019S в гене *LRRK2*. В двух сериях эксперимента для нейротрансплантации использовали как клетки с исходной мутацией, так и изогенные «нормализованные» клетки, подвергнутые геномному редактированию с применением искусственной эндонуклеазной системы CRISPR/Cas9. Трансплантация нейрональных предшественников проводилась в стриатум крыс унилатерально на стороне повреждения. Изучение изменений поведения экспериментальных животных выполняли с помощью теста «открытое поле» и теста условных реакций пассивного избегания (УРПИ). Полученные данные обрабатывали в программе Statistica 7.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты исследования. В работе были осуществлены сборка плазмид, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, липофильная трансфекция ИПСК терапевтическими генетическими конструкциями (плазмиды, одноцепочечные донорные молекулы ДНК), подбор пар РНК-гидов, обеспечивающих восстановление в культуре ИПСК нормального генотипа. В результате геномного редактирования удалось восстановить нормальную нуклеотидную последовательность в обоих аллелях гена *PARK2*, исправив экзонную (del202-203AG) и интронную (IVS1+1G/A) мутации. В результате редактирования гена *LRRK2* была получена гетерогенная культура, в части клеток, которой достигнуто целевое введение корректного нуклеотида G в положение 6055; после этого был выделен клон, несущий нативную нуклеотидную последовательность.

Далее проводили трансплантацию мутантных и «нормализованных» изогенных нейрональных предшественников, полученных из ИПСК пациента с аутосомно-доминантной формой БП (точечная мутация в гене *LRRK2*) и подвергнутых геномному редактированию с использованием искусственной эндонуклеазной системы CRISPR/Cas9.

Введение нейрональных предшественников в стриатум крыс приводило к постепенному восстановлению двигательной активности экспериментальных животных в обеих группах — с трансплантированными мутантными и «нормализованными» клетками. В тесте УРПИ животные с трансплантированными мутантными клетками продемонстрировали нарушенное воспроизведение условных реакций, тогда как у крыс, получивших трансплантацию «нормализованных» клеток, воспроизведение УРПИ оказалось сходным с таковым в норме. Различия между группами в величине латентного периода перехода животных в темный отсек были статистически высоко достоверными.

Обсуждение. Нами проведено успешное редактирование генома ИПСК, полученных из фибробластов пациента с БП — носителя компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *PARK2* и фибробластов второго пациента с БП — носителя точечной мутации G2019S в гене *LRRK2*. С помощью системы CRISPR/Cas9 удалось восстановить нормальную нуклеотидную последовательность двух этих генов, ассоциированных с разным возрастом дебюта симптомов паркинсонизма. Проведенное исследование на животной модели подтверждает возможность

коррекции нарушений моторики и когнитивных функций при экспериментальном паркинсонизме за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть ИПСК из соматических клеток (фибробластов). Геномное редактирование трансплантируемых клеток с исправлением каузальной мутации существенно улучшает результаты операции, что позволяет считать такой подход перспективным у пациентов с генетически обусловленными формами БП.

Выводы. Возможность коррекции генома и последующего получения из ИПСК нормальных дофаминергических нейронов имеет большое значение как для изучения молекулярных основ нейродегенеративной патологии, так и для успешного развития нейротрансплантации при БП и других социально значимых нейродегенеративных заболеваний.

Исследование поддержано грантом РФФ № 14-15-01047-П.

Литература:

1. Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. Неврологический журнал 2015; 20(4): 4–13.
2. Экстрапирамидные расстройства. Под ред. Штока В.Н., Ивановой-Смоленской И.А., Левина О.С. М: МЕДпресс-информ; 2002.
3. Wirdefeldt K., Adami H.-O., Cole P. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J. Epidemiol. 2011; 26(S1): 1–58.
4. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования генома TALEN и CRISPR/Cas-инструменты открытий. Acta Naturae. 2014; 23: 20–42.

УД5

И.П. Вохтанцев¹, А.В. Ендуткин^{1,2},
Л.М. Кулишова², Д.В. Ким¹, Д.О. Жарков^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ПРОТОСПЕЙСЕРЕ И РАМ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАСЩЕПЛЕНИЯ СИСТЕМОЙ CAS9/SGRNA

¹ Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

I.P. Vokhtantsev¹, A.V. Endutkin^{1,2}, L.M. Kulishova²,
D.V. Kim¹, D.O. Zharkov^{1,2}

THE EFFECT OF DNA DAMAGE IN PROTOSPER AND PAM ON CLEAVAGE EFFICIENCY BY CAS9/SGRNA SYSTEM

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

dzharkov@niboch.nsc.ru

Введение. Количество инструментов геномного редактирования стремительно увеличивается [1]. Наиболее распространенным среди них — система CRISPR/Cas9. Принцип действия Cas9/sgRNA заключается в том, что нуклеаза Cas9 в комплексе с sgRNA производят двуцепочечный разрыв в ДНК, содержащей протоспейсер и РАМ. Последующая репарация разрыва по пути соединения негомологичных концов

или гомологичной рекомбинации позволяет вносить в ДНК инсерции и делеции или точные замены, соответственно. Наличие мисматчей в последовательности протоспейсера влияет как на эффективность, так и на специфичность расщепления ДНК комплексом Cas9/sgRNA [2]. Эффективность же расщепления ДНК с повреждениями не была ранее изучена, поэтому цель данной работы заключается в исследовании эффективности расщепления ДНК субстратов с заменами как в протоспейсере, так и в РАМ комплексом Cas9/sgRNA.

Материал и методы. Рекомбинантный белок Cas9 получили согласно протоколу [3]. Синтез sgRNA, содержащей последовательность спейсера — Sp2[4], проводили с помощью *in vitro* транскрипции РНК-полимеразой фага Т7 с ДНК матрицы. Для проверки эффективности расщепления в качестве субстратов использовали дуплексы и плазмиды, содержащие протоспейсер и РАМ с повреждениями. Модификации ДНК выбрали следующие: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (охоG), уридин (U) и тетрагидрофурановый аналог АП-сайта (F). Для детекции расщепления в одну из цепей дуплекса вводили радиоактивную метку на 5'-конец. Олигонуклеотиды фосфорилировали полинуклеотидкиназой фага Т4 в присутствии (γ -³²P) АТФ. Меченый олигонуклеотид отжигали вместе с немеченным комплементарным олигонуклеотидом. Полученный дуплекс инкубировали с предварительно собранным комплексом Cas9/sgRNA. После остановки реакции проводили электрофорез в 20% денатурирующем ПААГ, затем использовали «фосфорные» пластины для регистрации радиоактивного излучения. Плазмиды с заменами получали с помощью удлинения праймера, содержащего повреждение, согласно методике [5]. Реакцию расщепления плазмидного субстрата анализировали в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Результаты исследования. Любые замены в последовательности РАМ (5'-TGG-3') гуанозина на тетрагидрофурановый аналог АП-сайта или 8-оксо-2'-дезоксигуанозин привели к потере субстратной специфичности для дуплексных субстратов. Противоположная ситуация наблюдалась, когда в качестве субстратов выступали плазмиды. Присутствие 8-оксо-2'-дезоксигуанозина во втором и третьем положениях РАМ частично снижало эффективность расщепления. Однако, тетрагидрофурановый аналог АП-сайта, находящийся в тех же положениях, не повлиял на расщепление комплексом Cas9/sgRNA. Эффективность расщепления дуплексов с модификациями в неадресной цепи протоспейсера уменьшалась в ряду (8G → F) — (8G → охоG) — (16C → U) — (14C → U), где (X → Y) — тип замены, а число — положение модификации относительно РАМ. Аналогичная зависимость наблюдалась и для плазмидных субстратов. Для адресуемой цепи протоспейсера также проведены исследования эффективности расщепления дуплексных и плазмидных субстратов комплексом Cas9/sgRNA.

Обсуждение. Механизм работы комплекса Cas9/sgRNA заключается в распознавании РАМ и последующем образовании гетеродуплекса sgRNA/протоспейсер. Любые замены в РАМ приводят к отсутствию расщепления, что подтверждается исследованиями на дуплексных субстратах. Отсутствие толерантности комплекса Cas9/sgRNA к типу субстрата с модификациями в РАМ говорит о специфичности функционирования системы. Мы предполагаем, что это обусловлено конформацией плазмиды, что приводит к изменению доступности сайта и энергии взаимодействия Cas9 с РАМ.

Выводы. Из полученных результатов можно сделать вывод, что расщепление ДНК комплексом Cas9/sgRNA

зависит не только от типа повреждения ДНК и его расположения, но и от типа субстрата.

Литература:

1. Guha T.K., Wai A., Hausner G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2017; 15: 146–60.
2. Zheng T., Hou Y., Zhang P. et al. Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–8.
3. Anders C., Jinek M. *In vitro* enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* 2014; 546: 1–20.
4. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816–21.
5. Parsons J.L., Dianov G.L. *In vitro* base excision repair using mammalian cell extracts. *Methods Mol. Biol.* 2012; 920: 245–62.

УДБ

Е.В. Григорьева^{1–4}, А. Сурумбаева^{1,2,4},
Т.Б. Маланханова^{1–4}, Е.В. Киселёва¹,
А.А. Малахова^{1–4}, С.М. Закян^{1–4}

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *HTT*, ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия

³ ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

E.V. Grigor'eva^{1–4}, A. Surumbayeva^{1,2,4},
T.B. Malankhanova^{1–4}, E. Kiseleva¹,
A.A. Malakhova^{1–4}, S.M. Zakian^{1–4}

GENERATION OF CELLULAR MODELS CARRYING MUTATIONS IN THE *HTT* GENE TO STUDY HUNTINGTON'S DISEASE

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² «E. Meshalkin National medical research center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Russian Federation, Novosibirsk, Russia

*evlena@bionet.nsc.ru

Введение. Клеточные модели являются перспективным инструментом исследования патологий, связанных с дисфункцией определённого типа клеток. Направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в узкоспециализированный

тип клеток, страдающих при различных заболеваниях, позволяет на данных клетках проводить исследования патологических клеточных механизмов, например, нарушение аутофагии [1], влияние химических соединений на жизнеспособность дифференцированных клеток, а также комплексно изучать взаимодействие различных типов клеток. Болезнь Гентингтона — прогрессирующее неизлечимое моногенное заболевание связанное с аномальным увеличением CAG-повторов в гене *Huntingtin (HTT)*, что приводит к поражению срединных шипиковых нейронов (СШН), составляющих 95 % нейронов стриатума. Данная патология на ранних стадиях приводит к нарушению моторики, стереотипности поведения, а на более поздних стадиях и когнитивным нарушениям [2]. Нами был разработан протокол направленной дифференцировки ИПСК человека в СШН с возможностью продолжительного культивирования клеток в стадии предшественников поддающихся модификации генома с использованием CRISPR/Cas9.

Материал и методы. На первом этапе направленной дифференцировки происходит нейрональная индукция ИПСК, вызывающая появление общих нейральных предшественников. Второй этап включает культивирование клеток в стадии предшественников СШН с последующей дифференцировкой в зрелые нейроны путем добавления нейротрофических факторов. Эксперименты по трансфекции генетических конструкций в предшественники СШН проводили на приборе Neon Transfection System и с помощью реактива Lipofectamine 3000.

Результаты исследования. Нами был отработан протокол направленной дифференцировки ИПСК в СШН, позволяющий продолжительно культивировать клетки в стадии предшественников, что значительно увеличивает массу клеток. На начальной стадии дифференцировки более 80 % клеток экспрессировали маркеры ранней нейроэктодермы *SOX1* и переднего мозга *OTX2*. Тогда как на стадии предшественников СШН клетки продолжают экспрессировать гены *SOX1* и *OTX2*, а при созревании переходят в ГАБАергические зрелые СШН, экспрессирующие ген *DARPP32*, а также поздние маркеры латерального ганглионарного бугорка, *MEIS2* и *ISL1*, являющегося предшественником вентрального стриатума (более 88 % клеток). Более того, показано, что клетки в стадии предшественников способны подвергаться модификации генома с использованием современного молекулярно-генетического инструмента редактирования генома клеток CRISPR/Cas9. Такая возможность позволяет получить панель изогенных клонов, отличающихся точечными мутациями и в одну стадию дифференцировать предшественники в зрелые СШН, что значительно упрощает исследования определённых мутаций на выживаемость СШН.

Обсуждение. СШН, полученные при направленной нейрональной дифференцировки ИПСК являются перспективным современным инструментом в исследовании патогенеза болезни Гентингтона. Одним из требований является чистота получаемого релевантного типа клеток и высокая эффективность направленной дифференцировки, о чем говорит высокий процент клеток, экспрессирующих маркер вентрального стриатума, *ISL1* и *GABA*. Возможность в процессе направленной дифференцировки нарастить большую массу клеток, которые подвергаются модификации генома, даёт ещё одно преимущество для исследования патологии болезни Гентингтона.

Выводы. Впервые была показана возможность модификации генома клеток предшественников СШН

с помощью системы CRISPR/Cas9, что позволит получать изогенные культуры клеток предшественников СШН. Данные исследования, а также изучение влияния химических соединений на функционирование и жизнеспособность терминально дифференцированных СШН позволят разработать оригинальную клеточную систему на основе нейрональных предшественников, моделирующих болезнь Гентингтона и найти новые мишени для лекарственных препаратов в терапии данного заболевания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10128.

Литература:

1. Martin, D.D., Ladha S., Ehrnhoefer D.E. et al. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in Neurosciences* 2015; 38(1): 26–35.
2. Graybiel A.M. The basal ganglia: Learning new tricks and loving it. *Current Opinion in Neurobiology* 2005; 15(6): 638–44.

УД7

S.D. Dangol*, M.E. Caliskan, A. Bakhsh**

AN INSIGHT INTO GENE EDITING TECHNOLOGIES AND ROLE OF CRISPR IN PLANT IMPROVEMENT

*Department of Agricultural Genetic Engineering,
Faculty of Agricultural Science and Technologies, Nigde
Omer Halisdemir University, Nigde, Turkey*

*sarbesh_dangol@outlook.com,

**abthebest@gmail.com

The bacterial immunity system, that makes the use of CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) against the viral attacks, has been utilized recently in editing plant genes in association with the RNA-guided nucleases. This pioneering technology takes the advantage of the natural error-prone repair system known as non-homologous end joining (NHEJ) pathway followed by double strand break. This repair pathway effectively knocks out the gene by bringing about a small number of deletions or insertions of nucleotide bases. The repair can also be mediated by homology-directed repair (HDR) in presence of the donor gene with a homologous fragment to the flanking sequence. The genome-wide off-target mutation has been alluded to the target-specific seed sequence in the single-guided RNA (sgRNA) which may tolerate a few nucleotide bases, thereby off-targeting the non-target genes. Dead Cas9 (dCas9), which are the disrupted nucleases, has been exploited in gene expression regulation. Catalytically inactive Cas9 protein enzymes have been adhered to the Fok I nucleases that require these inactive proteins to act in dimers to be able to cleave the DNA using a pair of sgRNAs effectively mitigating the probable off-target mutations. With the passage of time, the other nucleases like Cas12 (previously called Cpf1), Cas13a (previously called C2c2), Cas13b, etc. have been discovered, scrutinized and developed in the amelioration of efficient gene editing technology, and to offset the likelihood of off-targeting. In our presentation, we aim to recapitulate the major achievements and impediments of different CRISPR technologies envisaged for plant gene editing as well as their future outlook.

Acknowledgment. We thank TUBITAK 2215 for providing fully-funded PhD scholarship to Mr. Sarbesh Das Dangol.

УД8

А.О. Жданова¹, А.Л. Русанов¹,
А.В. Лисица², Н.Г. Лузгина^{1,2*}

К ВОПРОСУ О ПРАВОВОМ СТАТУСЕ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА КАК ОБЪЕКТЕ БИОМЕДИЦИНСКИХ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

¹ ООО НПО «Перспектива», Новосибирск, Россия

² ИБМХ им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

A.O. Zhdanova¹, A.L. Rusanov¹, A.V. Lisitsa²,
N.G. Luzgina^{1,2*}

ON THE ISSUE OF THE LEGAL STATUS OF HUMAN EMBRYOS AS AN OBJECT OF BIOMEDICAL RESEARCH

¹ RMA «Perspectiva», Novosibirsk, Russia

² V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

*ngluzgina@gmail.com

Введение. Бурное развитие технологий редактирования генома различных организмов обнажило морально-этические проблемы, ассоциированные с данными исследованиями, и их недостаточное законодательное регулирование в РФ и в мире. Особенно остро и неоднозначно стоит вопрос с редактированием генома эмбрионов человека, правовой статус которых остается неопределенным.

Материал и методы. Проведен анализ правового регулирования биомедицинских исследований эмбриона человека, включая эксперименты по редактированию его генома, на территории РФ и в мире. Объектом исследования были обязательные для РФ нормы международного права, Конституция РФ, федеральные конституционные законы, федеральные законы и подзаконные нормативные акты (ФЗ № 86-ФЗ; ФЗ № 358-ФЗ; ФЗ № 180-ФЗ; ФЗ № 323-ФЗ; ФЗ № 54-ФЗ).

Результаты исследования и обсуждение. Проблема определения момента начала правовой охраны человеческой жизни находится в центре внимания ряда ведущих исследователей в области конституционного права [1–6]. Однако в настоящее время в РФ и в мире не выработано единое консенсусное определение правового статуса эмбриона человека. Есть точка зрения об абсолютной ценности человеческого эмбриона на всех этапах развития [4], а также противоположная, что эмбрион человека имеет незначительную ценность или вообще её лишен [5]. Приверженцы умеренной позиции связывают возникновение у эмбриона права на жизнь с определенным уровнем развития или достижением жизнеспособности [4].

Анализ ряда правовых норм (ст. 1116 ГК РФ; ст. 123 УК РФ) позволяет сделать вывод, что в некоторых случаях жизнь и телесная неприкосновенность эмбриона выступает в качестве объекта, охраняемого уголовным, гражданским и другими отраслями права. Однако Конституция РФ исключает правовую охрану нерожденного. Налицо противоречие между Основным законом и отраслевым законодательством. Есть мнение, что закрепление в Конституции РФ экстенсивного понятия права на жизнь позволит разрешить существующие коллизии [4–6].

Федеральным законом № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» введен запрет на создание эмбриона человека в целях производства биомедицинских

клеточных продуктов, а также на использование для разработки, производства и применения биомедицинских клеточных продуктов биологического материала, полученного путем прерывания процесса развития эмбриона человека или нарушения такого процесса. Однако его действие не распространяется на использование эмбриона человека в научных целях. Как и действие Федерального закона № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», в котором отражено, что граждане имеют право на криоконсервацию и хранение своих половых клеток, тканей репродуктивных органов и эмбрионов, однако данные объекты не могут быть использованы для промышленных целей. Данная норма права не содержит разрешения на эксперименты с эмбрионами человека, однако не содержит и прямого запрета на такие эксперименты. Следовательно, научные исследования в области редактирования генома эмбриона человека находятся вне рамок правового поля действия федеральных законов РФ.

Также законодательно не урегулированы вопросы о степени возможного распоряжения эмбрионами до момента начала их развития в материнском организме, об уточнении субъективных прав их биологических создателей, а также о возможности и условиях использования эмбрионов человека в исследовательских целях.

Таким образом, в отечественной правоприменительной практике окончательно закрепился новый объект — эмбрион человека, правовой статус которого нуждается в детализации, а правовой режим использования — в устранении ряда пробелов. Значимость данного вопроса для правовой науки и общества определена потенциальной способностью эмбриона стать человеком.

Литература:

1. Романовский Г.Б., Тарусина Н.Н., Мохов А.А. и др. Биомедицинское право в России и за рубежом: монография. М.: Проспект; 2015.
2. Васильев Г.С. На пути к киборгам: отечественное законодательство о клонировании. Закон 2016; 9: 153–162.
3. Зайцева А.М. Начало жизни человека как граница конституционной правоспособности. Конституционное и муниципальное право 2012; 10: 17–24.
4. Перевозчикова Е.В., Панкратова Е.А. Конституционное право на жизнь и правовой статус эмбриона человека. Медицинское право 2006; 2: 16–23.
5. Гландин С.В. О статусе эмбриона человека в свете права на уважение личной и семейной жизни в европейском и российском праве. Закон 2014; 4: 136–141.
6. Лякишева Ю.А. Уголовно-правовая ответственность в области генно-инженерной деятельности. Актуальные проблемы российского права 2008; 4: 290–296.

УД9

М.К. Живень^{1–3}, И.С. Захарова^{1–3},
А.М. Смирнова^{1,3,4}, А.И. Шевченко^{1–4},
К.Е. Орищенко¹, Е.А. Елисафенко^{1–3}, С.М. Закиян^{1–4}

CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЛИНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HIF — ФАКТОР, ИНДУЦИРУЕМЫЙ ГИПОКСИЕЙ

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

² ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр им акад. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

M.K. Zhiven^{1–3}, I.S. Zakharova^{1–3}, A.M. Smirnova^{1,3,4},
A.I. Shevchenko^{1–4}, E.A. Elisaphenko^{1–3},
S.M. Zakian^{1–4}

CRISPR/CAS9-MEDIATED OBTAINING OF GENETICALLY MODIFIED HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS EXPRESSING HIF — HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR

¹ The Federal research center The Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

zhiven92@mail.ru

Введение. Адаптация клеток к гипоксическим условиям опосредуется в значительной степени группой транскрипционных факторов, известных как факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs). HIFs экспрессируются и деградируют в условиях нормоксии, но стабилизируются при гипоксии [1]. Субъединица HIF-2 α участвует в регуляции транскрипционных факторов, контролирующих процессы самообновления в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК), а также в индукции эпигенетических изменений, которые способствуют улучшению регенеративного потенциала производных ЭСК [2]. Кроме того, HIF-2 α вовлечен в патологические процессы сердечно-сосудистой системы и онкологических заболеваний. Исследование молекулярных механизмов действия HIFs позволит разработать эффективные методы лечения подобных болезней.

Материал и методы. В данной работе получены генетически-модифицированные линии плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека со стабильной экспрессией HIF-2 α в нормоксических условиях, реализованной посредством сайленсинга его ингибитора INT6/eIF3 с использованием системы CRISPR/Cas9.

Последовательности направляющих РНК подобраны таким образом, чтобы получилась делеция, включающая точки старта транскрипции и начало первого экзона гена *INT6/elf3*. Полученные генетические конструкции доставлены в ПСК человека с помощью нуклеофекции.

Результаты исследования и обсуждение. В результате субклонирования получены генетически-модифицированные ПСК человека с делецией размером 220 п.н., включающей требуемый участок *INT6/elf3*. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени, уровень экспрессии *INT6/elf3* в генетически-модифицированных субклонах достоверно снижен. При этом уровень экспрессии *HIF-2α* достоверно повышен по сравнению с контрольной линией ИПСК. Методом вестерн-блотинга подтверждено наличие белкового продукта *HIF-2α*. Полученные субклоны обладают всеми функциональными и морфологическими особенностями плюрипотентных клеток. С помощью количественной ПЦР в реальном времени обнаружен повышенный уровень экспрессии генов плюрипотентности в сравнении с исходной клеточной линией. По литературным данным известно, что *HIF-2α* играет важную роль в контроле плюрипотентности за счет взаимодействия с цис-регуляторным элементом OCT-SOX, что приводит к формированию транскрипционно активного хроматина, а также белкового комплекса, который стабилизирует и усиливает экспрессию *NANOG* в гипоксических условиях.

Выводы. В результате выполненной работы получены линии генетически модифицированных ПСК человека с делецией *INT6/elf3*, которые моделируют в ноксических условиях состояние длительной гипоксии с повышенной экспрессией *HIF-2α*. Полученные данные позволяют изучить взаимосвязь изменения уровня экспрессии *HIFs* с экспрессией таргетных ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ИПСК и ЭСК человека, что необходимо для понимания молекулярных механизмов *HIF*-сигнального пути и разработки новых эффективных подходов терапевтического ангиогенеза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-75-10047.

Литература:

1. Dengler V.L., Galbraith M., Espinosa M.J. Transcriptional regulation by Hypoxia Inducible Factors. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2014; 49 (1): 1–15.
2. Petruzzelli R., Christensen D.R., Parry K.L. et al. *HIF-2α* regulates *NANOG* expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox cis regulatory element. PLoS ONE 2014; 9(10): e108309.

УД10

Е.С. Журавлев^{1}, И.П. Вохтанцев^{2**},
Л.М. Кулишова¹, В.А. Рихтер¹,
Д.О. Жарков^{1,2}, Г.А. Степанов^{1,2*}**

МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ SGRNK В КОМПЛЕКСЕ CAS9/SGRNA ВЫЗЫВАЮТ НАКОПЛЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ В ДНК-СУБСТРАТЕ

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

E.S. Juravlev^{1}, I.P. Vohtancev^{2**}, L.M. Kulishova¹,
V.A. Richter¹, D.O. Zharkov^{1,2}, G.A. Stepanov^{1,2*}**

NUCLEOTIDE MODIFICATIONS IN SGRNAS BIAS CAS9 TOWARDS NICKASE ACTIVITY

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*stepanovga@niboch.nsc.ru

**авторы внесли равный вклад в исследование

Введение. На сегодняшний день система CRISPR-Cas9 является наиболее распространенным и эффективным методом редактирования генома в клетках млекопитающих. Целевое действие нуклеазы Cas9 обеспечивают направляющие РНК (gРНК), в качестве которых могут выступать как природные tracrРНК:crРНК-комплексы, так и химерные sgРНК. Системы редактирования с использованием химически или ферментативно синтезированных gРНК позволяют получать временную экспрессию необходимых функциональных компонентов, снижая при этом вероятность нецелевого воздействия. Кроме того, применение синтетических sgРНК даёт возможность вводить в их структуру химические модификации, которые придают требуемые свойства направляющим РНК, в том числе повышают их стабильность, а также снижают иммунотоксическое действие на клетки [1, 2].

В данной работе в качестве модели для исследования был выбран комплекс белка Cas9 с синтетическими sgРНК, содержащими в своей структуре природные модификации нуклеотидов: *N*⁶-метиладенозин (*m*⁶A), псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (*m*⁵C).

Материал и методы. Синтез sgРНК проводили методом транскрипции *in vitro* с применением РНК-полимеразы фага Т7. Глубину модификации от 10 до 100% варьировали изменением исходных соотношений *m*⁶ATP/ATP, *m*⁵CTP/CTP, ΨTP/UTP в реакционных смесях. Для очистки продуктов транскрипции использовали препаративную офВЭЖХ. Оценку глубины модификации проводили с помощью исчерпывающего ферментативного гидролиза sgРНК до нуклеозидов в смеси, содержащей рибонуклеазу А, нуклеазу Р1, фосфодиэстеразу I и щелочную фосфатазу, с последующей аналитической офВЭЖХ с многоволновой УФ-детекцией.

Для анализа влияния модификаций на цитотоксичность и активацию системы врожденного иммунного ответа проводили трансфекцию клеток человека с последующим анализом жизнеспособности клеток и уровня активации интерферон-чувствительных генов.

Для оценки эффективности работы комплексов Cas9/модифицированная-sgРНК проводили расщепление модельных радиоактивно меченых дуплексов длиной 35 п.н. и плазмидной ДНК *in vitro*.

Результаты исследования и обсуждение. Анализ эффективности расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 *in vitro* с различными модифицированными sgРНК показал, что введение в структуру sgРНК *m*⁶A снижает общую эффективность расщепления субстрата на 18–23%. С увеличением глубины *m*⁶A-модификации наблюдали повышение выхода релаксированной формы субстрата в 2–5 раз, что указывает на накопление форм с одноцепочечными разрывами. Полученный результат позволяет заключить, что введение модификаций в структуру sgРНК изменяет соотношение активностей доменов RuvC и HNH. Анализ расщепления модельного дуплекса по неадресной цепи выявил значительное снижение эффективности

гидролиза, катализируемого Cas9, при полной замене канонических мономеров на m^6A и Ψ . Дополнительное свойство модифицированных sgPНК, обеспечивающее преимущество их использования, было установлено при трансфекции в клетки человека. Было показано, что введение в структуру направляющих PНК Ψ и m^5C существенно снижает как иммуностимулирующее, так и цитотоксическое действие синтетических sgPНК.

Выводы. Таким образом, модификации в структуре синтетических sgPНК могут быть использованы для контроля общей эффективности гидролиза субстрата. Кроме того, стратегия модификации нуклеотидов sgPНК может быть использована для регуляции одноцепочечной эндонуклеазной активности Cas9 без изменения структуры самого белка.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-6196.2018.4).

Литература:

1. Yin H., Song C.Q., Suresh S. et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nature biotechnology* 2017; 35(12):1179–87.
2. Basila M. Kelley M.L., Smith A.V.B. Minimal 2'-O-methyl phosphorothioate linkage modification pattern of synthetic guide RNAs for increased stability and efficient CRISPR-Cas9 gene editing avoiding cellular toxicity. *PloS One* 2017; 12(11): e0188593.

УД11

Н.А. Золотарев, О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев **CRISPR/CAS9 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ** **АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА** **DROSOPHILA MELANOGASTER**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

N. Zolotarev, O. Maksimenko, P. Georgiev **CRISPR/CAS9 FOR STUDYING OF CHROMATIN** **ARCHITECTURAL PROTEINS OF DROSOPHILA** **MELANOGASTER**

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

nikolay.zolotarev@yandex.ru

Введение. Геном эукариот упакован в сложную иерархическую структуру, которая определяет принципы регуляции экспрессии генов. Механизмы, лежащие в основе этой укладки, являются одним из фундаментальных вопросов современной молекулярной биологии. У млекопитающих на данный момент обнаружен единственный архитектурный ДНК-связывающий белок — CTCF, у дрозофилы известно несколько подобных белков (dCTCF, Su(Hw), Zwi5). В нашей лаборатории были найдены новые архитектурные белки дрозофилы — Pita, ZIPIC, Opbp [1,2].

Для исследования архитектурных белков мы используем *in vitro* методы, а также различные трансгенные системы для изучения функций белков *in vivo*. Однако использование CRISPR/Cas9 позволило нам перейти к изучению генов в естественном окружении, не только получая нокаутные линии, но и заменяя ген дикого типа различными производными.

Материал и методы. Для работы использовались линии мух из Bloomington Drosophila Stock Center (58492, 54591, 1092, 6934). Для экспрессии sgRNA мы модифицировали плазмиды, описанные в статье [3,4]. Метод проведения делеции и восстановления гена описан в статье [2].

Результаты исследования. Нами было протестировано несколько вариантов нокаута генов с помощью CRISPR/Cas9. Первый способ — получение коротких делеций в кодирующей последовательности при внесении одного разрыва и последующим негомологичном соединении концов (НСК). Таким методом мы получили две линии с нокаутом гена *CTCF*. Обе линии были проверены с помощью ПЦР и секвенирования, а также проявляли фенотип, сходный с ранее описанными мутациями *CTCF*. Важно отметить, что в данном эксперименте наличие известной мутантной линии и определенное фенотипическое проявление ноль-мутации значительно облегчило отбор линий с мутацией.

Второй способ нокаута — делеция целевого гена с помощью двух разрывов и НСК. Этим способом мы получили линии с делецией гена *CG1792*. Необходимо заметить, что линии можно было отбирать только с помощью ПЦР, так как известная мутантная линия отсутствует.

Наконец, чтобы облегчить отбор нокаутных линий, мы использовали метод с гомологичной рекомбинацией вырезаемой последовательности на конструкцию с репортерным геном *mCherry*. Это позволило нам не только детектировать делеции на уровне фенотипа мух, но и вносить любые дополнительные последовательности в геном. Мы добавили сайт attP для $\phi C31$ -зависимой рекомбинации, что позволило встраивать различные трансгенные конструкции на место делеции.

Такая схема позволяет встраивать различные производные гена. Например, добавляя домены для аффинной очистки или окрашивания антителами (3xFLAG, 3xHA), флуоресцентные белки (GFP, Halo-tag), деградон (AID). Также можно встраивать белки с делецией определенных доменов для изучения их функций. При этом экспрессия гена происходит в естественном окружении.

Для удаления маркерных генов мы использовали Cre/lox-рекомбинацию. При этом в геноме остается lox-сайт, но если он находится в интроне, то не влияет на экспрессию белка. Таким методом мы получили делеции нескольких генов: *CTCF*, *opbp*, *CG10321*, *CG1792* и некоторых других. Однако не во всех генах перед кодирующей последовательностью присутствует интрон. Для работы с этими генами, мы добавили в нашу систему сайт узнавания мегануклеазы I-SceI и участки для гомологичной рекомбинации. Такая модификация используемой системы геномного редактирования позволила нам получить бесшовные соединения модифицированной конструкции с геномом.

Обсуждение и выводы. Наш опыт показывает, что применение CRISPR/Cas9 для модификации генома дрозофилы открывает очень большие возможности при изучении функций отдельных генов. Сочетание с классическими генетическими методами, гомологичной и сайт-специфичной рекомбинацией, позволяет использовать CRISPR/Cas9 для эффективного направленного изменения необходимых генов.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00285.

Литература:

1. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V. et al. Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res.* 2015; 25(1): 89–99.

- Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(21): 12285–300.
- Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D. et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* 2014; 196(4): 961–71.
- Port F., Chen H.-M., Lee T. et al. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *PNAS USA* 2014; 111(29): E2967–76.

УД12

А.А. Зотова¹⁻³, А.А. Атемасова¹, Е.В. Лопатухина^{1,3},
А.Н. Взоров¹, А.В. Филатов^{1,2}, Д.В. Мазуров^{2,3}

ПОИСК ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HIV-1 И HTLV-1 С ПОМОЩЬЮ СКРИНИНГА БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GECKO

¹ Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия

² «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
Москва, Россия

³ Институт биологии гена РАН, Группа клеточных
и генных технологий, Москва, Россия

A.A. Zotova¹⁻³, A.A. Atemasova¹, E.V. Lopatukhina^{1,3},
A.N. Vzorov¹, A.V. Filatov^{1,2}, D.V. Mazurov^{2,3}

GECKO LIBRARY SCREENING FOR IDENTIFICATION OF HIV-1 AND HTLV-1 REPLICATION FACTORS

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

² NRC Institute of Immunology FMBA of Russia,
Moscow, Russia

³ Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

ashunaeva@gmail.com

Введение. Вирус иммунодефицита (HIV-1) и Т-лимфотропный вирус первого типа (HTLV-1) относятся к патогенным ретровирусам человека. HIV-1 заражает преимущественно CD4 Т-лимфоциты и является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИДа). HTLV-1 заражает CD4 и CD8 Т-лимфоциты и вызывает развитие острого Т-клеточного лейкоза и воспалительный аутоиммунно-дегенеративный процесс в спинном мозге. Репликация обоих ретровирусов зависит от множества клеточных белков, в совокупности называемых факторами репликации. В отличие от факторов рестрикции, факторы репликации обеспечивают перmissивность клетки для размножения вируса. Мы разработали метод поиска факторов репликации HIV-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO на основе CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома. Каждая клетка библиотеки содержит нокаут в одном из 18080 генов [1]. При заражении библиотеки вирусами HIV-1 и HTLV-1 удалось выявить устойчивые к инфекции популяции клеток. В результате глубокого секвенирования и последующего анализа были выявлены гены-кандидаты факторов репликации данных ретровирусов.

Материал и методы. Клетки линий CEM и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов служили мишенями в инфекционных тестах HIV-1 и HTLV-1. Заражение HIV-1 проводилось в дозе 0,5 MOI. Зараженные клетки погибали вследствие апоптоза, тогда как устойчивые

к инфекции клетки выживали. Инфекция HTLV-1 ставилась путем совместного культивирования клеток линии MT2, продуцирующих вирус HTLV-1, и клеток с библиотекой нокаутов. Инфицированные клетки с библиотекой нокаутов переставали делиться вследствие ареста клеточного цикла вирусным белком Tax. Далее, чтобы элиминировать MT2 клетки, образцы растили в присутствии пуромицина, к которому клетки с библиотекой нокаутов резистентны. В итоге, оставались только клетки, устойчивые к инфекции HTLV-1. Пул gRNA, амплифицированных с ДНК клеток, резистентных к инфекции HIV-1 и HTLV-1, отправляли на глубокое секвенирование.

Результаты исследования. Мы провели сравнительный анализ таргетных последовательностей gRNA в клетках, прошедших отбор в результате инфекции HIV-1 и HTLV-1, и сравнили частоту встречаемости нокаутов генов в этих клетках по сравнению с исходными клетками библиотеки. Было проанализировано четыре библиотеки после HIV-1 инфекции и найдено несколько десятков нокаутов генов, потенциально необходимых для репликации. Среди них наиболее перспективными кандидатами оказались гены *tgfb1*, *smu1*, *magea3*, *ndufa10*, *polb* и *tnfrsf1a*. Кроме того, мы получили пул клеток, резистентных к инфекции HTLV-1, и обнаружили в этой популяции около десяти наиболее встречающихся генетических нокаутов, в их числе нокауты генов *kpna1* и *cd82*.

Обсуждение. Найденные предполагаемые факторы репликации HIV-1 и HTLV-1 описаны в ряде недавних исследований, связанных с изучением данных или близкородственных вирусов. Это позволяет считать разработанный скрининговый тест релевантным. Так, для обнаруженного в ходе исследования фактора сплайсинга SMU1 известно, что отсутствие его экспрессии приводит к снижению репликации HIV-1 в клетках Jurkat [2]. Для найденных потенциальных факторов репликации HTLV-1 известно, что KPNA1 обеспечивает репликацию ряда вирусов путем взаимодействия с вирусными белками и их импорта в ядро: UL84 цитомегаловируса, VP24 вируса Эбола и Vpr HIV-1 [3–5]. Однако роль KPNA1 в репликации HTLV-1 неизвестна. Поверхностный белок тетраспанин CD82 взаимодействует с коровым белком Gag [6] и с Env вируса HTLV-1 [7], что может способствовать инкорпорации Env в вирусные частицы. Роль экспрессии CD82 на клетках-мишенях в репликации HTLV-1 на данный момент неизвестна.

Выводы. Мы разработали тест для скрининга факторов репликации HIV-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO, основанный на гибели или прекращении деления чувствительных к вирусу клеток, и нашли ряд неизученных факторов, участвующих в репликации данных вирусов.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00712.

Литература:

- Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84–7.
- Yeung M.L., Houzet L., Yedavalli V.S.R.K. et al. A genome-wide short hairpin RNA screening of Jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(29): 19463–73.
- Lischka P., Sorg G., Kann M. et al. A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin alpha/beta pathway. *J. Virol.* 2003; 77(6): 3734–48.

4. Reid S.P., Leung L.W., Hartman A.L. et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J. Virol.* 2006; 80(11): 5156–67.
5. Popov S., Rexach M., Zybarch G. et al. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* 1998; 17(4): 909–17.
6. Mazurov D., Heidecker G., Derse D. HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* 2006; 346(1): 194–204.
7. Pique C., Lagaudrière-Gesbert C., Delamarre L. et al. Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 2000; 276(2): 455–65.

УД13

К.А. Иванова¹, С.В. Герасимова¹, А.А. Егорова^{1,2},
Е.Г. Комышев¹, М.А. Генаев¹, Д.В. Домрачев³,
К.А. Колошина¹, А.В. Кочетов^{1,2}, Е.К. Хлесткина^{1,2,4}

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ РЕДАКИРОВАНИЯ ГЕНОМА CAS9/GRNA ДЛЯ ДОМЕСТИКАЦИИ КАРТОФЕЛЯ DE NOVO

¹ ФГБНУ «ФИЦ ИЦГ СО РАН», Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский Государственный
Университет», Новосибирск, Россия

³ ФГБУН «НИОХ СО РАН», Новосибирск, Россия

⁴ ФГБНУ «ФИЦ ВИАГРР им. Н.И. Вавилова»,
Новосибирск, Россия

К.А. Ivanova¹, S.V. Gerasimova¹, A.A. Egorova^{1,2},
E.G. Komyshev¹, M.A. Genaev¹, D.V. Domrachev³,
K.A. Koloshin¹, A.V. Kochetov^{1,2}, E.K. Khlestkina^{1,2,4}

APPLICATION OF CAS9/GRNA GENOME EDITING SYSTEM FOR POTATO DE NOVO DOMESTICATION

¹ INSTITUTE OF CYTOLOGY AND GENETICS SB RAS,
Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ NIOCh SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
Novosibirsk, Russia

ivanova@bionet.nsc.ru

Направленная модификация генома с помощью системы Cas/gRNA, дает возможность выявлять гены доместикации родственных форм растений, анализировать их и вносить направленные изменения в эти гены, что открывает перспективу эффективного использования потенциала диких видов в селекции [1].

Целью данной работы является моделирование доместикации диких форм картофеля de novo методом на основе системы CRISPR/Cas и получения потенциальных доноров ценных признаков. На основе генетического материала диких видов картофеля создано множество новых сортов, в том числе материала из коллекции ВИР, насчитывающей более 8000 образцов [2].

Геном *Solanum tuberosum* (культурный картофель) был секвенирован в 2011 году [3]. В 2015 году был секвенирован геном дикого вида *Solanum commersonii*, и выявлены серьезные отличия от генома культурного картофеля [4]. В этом году был проведен обширный анализ генетических маркеров картофеля *S. tuberosum* и диких видов [5]. Установлены ключевые гены доместикации картофеля [6, 7]. Радикальными условиями процесса доместикации были высокая способность к образованию

клубней, а также съедобность клубней. Растениям семейства Solanaceae в целом присуще накопление в тканях стероидных гликоалкалоидов (СГА), что, в случае картофеля, приводит к токсичности и горечи клубней. Ключевые «гены доместикации» токсичности клубней и хорошей способности клубнеобразования идентифицированы, и могут быть потенциальными мишенями для модификации при помощи системы Cas/gRNA с целью элиминации нежелательных признаков.

В работе проведен обширный литературный обзор, на основе которого выбраны гены-мишени для модификации признаков токсичности [8] и клубнеобразования [9]. Одним из ключевых генов доместикации семейства Solanaceae является транскрипционный фактор GAME9, регулирующий накопление СГА. Одна из стратегий нашей работы основана на создании библиотеки аллелей гена GAME9. В качестве мишеней могут также служить гены гликозилазы SGT1, SGT2 и SGT3 — завершающие синтез СГА и, практически, не затрагивающие процессы метаболизма. За улучшение клубнеобразования отвечает ключевой ген этого процесса, *StSP6A* [9], который также изучается в качестве мишени для модификации.

В нашей работе была создана коллекция диких видов картофеля, в нее вошло 36 образцов 14 видов, любезно предоставленных коллегами из коллекции ВИР. Образцы картофеля были отобраны на основе таких характеристик, как различная способность к клубнеобразованию и различное содержание СГА.

Коллекция подробно фенотипируется, в том числе уникальным авторским методом [10], на основе которого создано бесплатное приложение, совместимое с ОС Android (<https://play.google.com/store/apps/details?id=org.wheatdb.seedcounter&hl=ru>). Метод был адаптирован специально для диких форм картофеля. Проводится генотипирование коллекции оптимизированным для диких видов картофеля методом анализа микросателлитных маркеров [11]. Коллекция введена в культуру in vitro и проходит тестирование на способность к регенерации in vitro и соматическому эмбриогенезу. Ведется постановка и отработка методов определения содержания СГА в тканях картофеля методом ВЭЖХ для анализа этого признака у образцов коллекции.

На основе последовательностей генов *SGTs* производится дизайн конструкций для нокаута этих генов при помощи сайт-направленной нуклеазы Cas9. Ведется структурно-функциональный анализ генов *GAME* и их гомологов, разрабатываются стратегии направленной модификации генов, регулирующих токсичность пасленовых на основе применения множественных gRNA.

Фундаментальным результатом этой работы станет характеристика процесса доместикации картофеля на молекулярном уровне и понимание его механизмов. Разработанная биоинженерная платформа на основе метода Cas/gRNA позволит искусственно восстанавливать события доместикации и получать новый материал для селекции на основе диких форм картофеля.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00068.

Литература:

1. Хлесткина Е.К. Геномное редактирование как машина времени, или Доместикация за пару лет. *Наука из первых рук* 2016; 71 (5–6): 72–5.
2. Рогозина Е.В., Бекетова М.П., Хавкин Э.Е. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. Под ред. Киру С.Д. СПб.: ВИР; 2007; 163: 90–100.

3. Potato Genome Sequencing Consortium Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 2011; 475(7355): 189–95.
4. Aversano R., Contaldi F., Ercolano M.R. et al. The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. *The Plant Cell* 2015; 27 (4): 954–68.
5. Li Y., Colleoni C., Zhang J. et al. Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato. *Molecular plant* 2018; 11(3): 473–84.
6. Cárdenas P.D., Sonawane P.D., Pollier J. et al. GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nature communications* 2016; 7: 10654.
7. Dutt S. Manjul A.S., Raigond P. et al. Key players associated with tuberization in potato: potential candidates for genetic engineering. *Critical reviews in biotechnology* 2017; 37 (7): 942–57.
8. Иванова К.А., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. Регуляция биосинтеза стероидных гликоалкалоидов картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2018; 22 (1): 25–34.
9. Abelenda J.A., Navarro C., Prat S. Flowering and tuberization: a tale of two nightshades. *Trends in plant science* 2014; 19 (2): 115–22.
10. Komyshev E., Genaev M., Afonnikov D. Evaluation of the Seed Counter, A Mobile Application for Grain Phenotyping. *Frontiers in plant science* 2017; 7: 1990.
11. Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В. и др. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2017; 21 (1): 124–7.

УД14

О.И. Кершанская¹, Ж. Кули¹,
А. Мауленбай¹, Д. Нелидова¹, К.Р. Утеулин¹,
С.Н. Нелидов¹, Дж. Стефенс²

**РАЗРАБОТКА НОВОЙ CRISPR/
CAS9 ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ
ГЕНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭЛИТНЫХ
СОРТОВ ЯЧМЕНЯ В КАЗАХСТАНЕ
И ВЕЛИКОБРИТАНИИ**

¹ Институт биологии и биотехнологии растений,
Алматы, Казахстан

² Институт Джеймса Хаттона, Данди, Великобритания

O.I. Kershanskaya¹, J. Kuli¹, A. Maulenbai¹,
D. Nelidova¹, K.R. Uteulin¹, S.N. Nelidov¹,
J. Stephens²

**ESTABLISHMENT OF NEW GENE EDITING
CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY FOR CREATION
OF ELITE BARLEY CULTIVARS IN KAZAKHSTAN
AND UK**

¹ Institute Plant Biology and Biotechnology, Almaty,
Kazakhstan

² The James Hutton Institute, Dundee, Scotland, UK

gen_o.kersh@mail.ru

Introduction. The technology, a genome-editing tool called CRISPR-Cas9, revolutionized the life sciences when it appeared on the market in 2012. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) gene-editing is allowing rapid scientific advances in many fields, including human health and now it has been shown that crop research can also benefit from this latest exciting

technology. New study of CRISPR-Cas9 technology shows potential to improve crop efficiency. It is now proving useful in the plant science community as a powerful tool for the improvement of agricultural crops. It is estimated that up to 40% of harvest is lost worldwide to pests/diseases threatening our food supply. Barley is susceptible to many viral and fungal diseases that can result in drastically reduced yield and poor quality grain. Barley cultivars with improved resistance to fungal or viral pathogens will benefit farmers and the local economy by increasing harvest yields and grain quality. The main goals are to elaborate and evaluate new germ-line transformation technology for delivering both conventional and CRISPR/Cas9-based constructions into barley zygote, and new gene editing CRISPR/Cas9 technology for creation of elite fungal and viral diseases resistant barley cultivars.

Materials and methods. 5 UK barley cultivars (Tipple, Bowman, Ovation, Origin and Optic) and 5 KZ barley cultivars (Asem, Inkar, Sari-Arua, Arna, Saule). In this collaboration we will transfer the skills and technical knowledge -germ-line transformation and CRISPR/Cas9 genome editing technologies using knockout technique to target genes that have been shown to confer resistance to a broad range of fungal or viral diseases. Target genes, constructs for transformation: *Ac*-gene from *Amaranthus caudatus*, glucanase gene, eukaryotic translation initiation factor (eIF4E) that is required by many viruses for multiplication.

Results and Discussion. The KZ has developed a method for rapid genotype-independent transformation using *Agrobacterium pipetting*, similar to a pollen-transfection method for other cereals and close to conventional cross-hybridization that requires no tissue culture steps. At the start of the project the KZ team visited the UK lab to transfer knowledge and skills of the transformation method. During this time the KZ lab learned to make genome editing (CRISPR/Cas9) constructs for gene knockout. Our experience of using CRISPR/Cas9 based genome editing technology (in the UK lab) has proved to be very efficient resulting in over 50% of lines showing knock out of target gene. To date we have produced knockouts in 20 different genes in collaboration with other research groups. Removal of undesirable plasmid DNA including the Cas9 and guide RNA achieved following segregation and screening of 'clean' plants in the next generation that carry only the edited event. The classification of genome edited plants is currently under review to decide whether new breeding technologies including CRISPR/Cas9 are exempt from GM classification. As known RNAi silencing of eIF4E has conferred resistance to multiple viruses in melon and broad spectrum resistance to potyviruses in tomato. More recently, *Arabidopsis* complete resistance to Turnip Mosaic Virus has been successfully engineered by editing eIF4E using the CRISPR/Cas9 tool. Once the gene edited events are established in barley, the transformation cassette including Cas9 and guide RNA was segregated away from the edited event to leave a 'clean' mutation. The fungal cell wall is composed of chitin, glucans and other polymers. Homologs of both these genes *Ac* gene from *Amaranthus caudatus* have been overexpressed in a number of species and have shown various effects on fungal resistance. By targeting these main structural components we hoped to break down the fungal cell wall to prevent fungal attack. It has also been shown that enhancing glucanase activity in barley improves its quality as feed for livestock. Traditionally, barley-fed poultry have poor growth rates because they are deficient in glucanases and cannot fully break down endosperm cell walls. Feeding studies in literature have shown that poultry fed genetically modified barley with heat stable

glucanase outperformed poultry that were fed conventional barley. Introducing gene sequences using the CRISPR/Cas9-based technology is still inefficient so we used binary vectors containing a chitinase gene *Ac* and a heat stable glucanase gene for co-transformation experiments in barley. T1 seeds were germinated on antibiotic selection and confirmed as transgenic by PCR. Multiple seed from each independent barley line grown up as replicates and leaf tissue or whole plants used for assays with fungal spores (KZ) or virus isolates (UK) to determine resistance levels.

Conclusions.

1. The genome edited plants with fungus and virus resistance could be produced.
2. Edited plants could be segregated to produce 'clean' plants free of vector sequence which may be classified as GMO-free and suitable for future planting.
3. These new technologies will provide the means to target other quality traits (including agronomic and malting) for improved barley cultivars in the future.
4. The development of a new genotype-independent, plant friendly transformation protocol in barley will be interested to plant scientists enabling future experiments to be done in elite cultivars rather than the only transformable Golden Promise cultivar which is of little commercial importance.

УД15

Д.В. Ким^{1,2}, Л.М. Кулишова¹,
Н.А. Торгашева¹, Д.О. Жарков^{1,2}

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ДЕФИЦИТНЫХ ПО ГЕНАМ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ И МИСМАТЧ-РЕПАРАЦИИ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

D. Kim^{1,2}, L. Kulishova¹, N. Torgasheva¹,
D. Zharkov^{1,2}

GENERATION OF 293FT CELL LINES DEFICIENT IN BASE EXCISION REPAIR AND MISMATCH REPAIR BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

kim.daria.nsk@gmail.com

Введение. В клетке постоянно возникают повреждения ДНК, которые ставят под угрозу целостность генома. Существует несколько систем, ответственных за исправление повреждений, среди них — эксцизионная репарация оснований (BER) и мисматч-репарация (MMR). В число главных участников BER у человека входят апури-апиримидиновая (АП-) эндонуклеаза 1 (APEX1) и ДНК-полимераза β (POLB), а узнавание неправильно спаренных оснований в случае MMR инициируют гетеродимеры с белком MSH2. Для исследования роли этих белков предпринимали подходы по созданию нокаутных клеточных линий и мышиных моделей. Такие модельные объекты существуют только для *MSH2*,

но не для *APEX1* и *POLB*. Целью нашего исследования было получение линий клеток человека 293FT, дефицитных по генам *APEX1*, *POLB* и *MSH2*, с использованием технологии CRISPR/Cas9.

Материал и методы. С помощью биоинформатической платформы «benchling.com» для каждого гена было подобрано по три спейсера направляющих РНК (sgPНК). Затем последовательности спейсеров клонировали в вектор pX458 для экспрессии в эукариотических клетках нуклеазы Cas9, EGFP и sgPНК к целевому гену. Полученные конструкторы трансфицировали с помощью липофектамина 3000 в клеточную линию 293FT, производили сортировку и сбор GFP-положительных клеток. Эффективность адресации белка Cas9 каждой sgPНК оценивали методом TIDE, основанного на данных секвенирования по Сенгеру. Скрининг полученных субклонов производили с помощью анализа длин рестрикционных фрагментов. Наличие модификации подтверждали секвенированием по Сенгеру продуктов ПЦР, наработанных с районов действия белка Cas9. Субклоны с мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания, характеризовали методом иммуноблоттинга на наличие белка и функциональными тестами на активность белка.

Результаты исследования. В ходе работы было получено по три плазмиды pX458 со вставками различных спейсеров для генов *APEX1*, *POLB* и *MSH2*. Метод TIDE, который применялся для анализа эффективности адресации белка Cas9 каждой sgPНК, показал наиболее эффективные sgPНК с показателями 14,9 %, 29,6 % и 39,2 % для гена *APEX1*, *POLB* и *MSH2*, соответственно. В дальнейшей работе по получению линий клеток 293FT использовали наиболее активные sgPНК. Для этого плазмидные конструкторы трансфицировали в 293FT, производили сбор GFP-положительных клеток и осуществляли субклонирование. Было получено 36 субклонов, модифицированных по *POLB*, 133 и 114 субклонов по *APEX1* и *MSH2*, соответственно. В ходе скрининга субклонов методом анализа длин рестрикционных фрагментов было получено по 2 субклона с мутациями, уничтожающими исходный сайт рестрикции. Секвенированием по Сенгеру было подтверждено наличие мутаций сдвига рамки считывания. В ходе дальнейшей работы субклоны с модификацией по гену *APEX1* исследовали на наличие эндонуклеазной активности. Для этого использовали субстрат с тетрагидрофураном, который представляет аналог АП-сайта. Было показано отсутствие эндонуклеазной активности в экстрактах клеток полученных субклонов. Также производили исследование полимеразной активности у клонов, с модификацией по гену *POLB*. В этом случае стандартный субстрат представлял дуплекс, содержащий однонуклеотидную брешь. Для подтверждения наличия нокаута в полученных субклонах производили иммуноблот анализ для исследования наличия целевого белка.

Обсуждение. Получение жизнеспособных мышиных и клеточных моделей по генам, приводящим к ранней эмбриональной гибели, представляет собой уникальный инструмент для исследования роли этих генов в организме. Ранее использовали векторные конструкции замещающего типа, которые приводили к замене больших функциональных районов гена. Система CRISPR/Cas9 позволяет получить дефицитные модели за счет внесения незначительных изменений в структуру ДНК, ее использование представляет собой многообещающую возможность по получению нокаутов для генов с эмбриональной летальностью, таких как *APEX1* и *POLB*. Модели, полученные с помощью системы CRISPR/Cas9, обладают лишь

фенотипом, обусловленным отсутствием целевого белка, что делает их релевантным объектом исследования.

Выводы. Было получено три клеточные линии 293FT, дефицитные по генам *APEX1*, *POLB* и *MSH2* с помощью технологии CRISPR/Cas9. Характеристику фенотипа полученных клеток производили иммуноблоттингом и анализом активности на стандартных субстратах.

УД16

А.Н. Князев¹, И.В. Киров¹, А.С. Мамаева¹,
Д.Д. Харлампиева², В.Г. Згода³, В.Н. Лазарев²,
В.М. Говорун², И.А. Фесенко¹

ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОРОТКИХ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА *PHYSCOMITRELLA PATENS*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства», Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия

A. Knyazev¹, I. Kirov¹, A. Mamaeva¹,
D. Kharlampieva², V. Zgoda³, V. Lazarev²,
V. Govorun², I. Fesenko¹

THE DISCOVERY OF FUNCTIONAL SMALL OPEN READING FRAMES OF PLANTS USING MODEL PLANT, *PHYSCOMITRELLA PATENS*

¹ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

² Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

³ Laboratory of System Biology, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

agrofak@gmail.com

Введение. В геномах растений насчитывается более 100 тыс. транскрибируемых коротких открытых рамок считывания (КОРС, до 300 п.н.), из которых менее 1 % лежат на длинных некодирующих РНК. Пептиды, транслируемые с таких рамок, могут выполнять важные функции в регуляции роста и развития растений. Однако, наши знания о функционально значимых КОРС, ограничиваются лишь небольшим числом примеров. Целью нашей работы была идентификация пептид-кодирующих КОРС в геноме мха, *P. patens*, с помощью масс-спектрометрии и изучение функций кодируемых ими пептидов с помощью создания CRISPR/Cas9 нокаутных линий. Ранее нами были идентифицированы сотни КОРС, кодирующие пептиды длиной до 100 аминокислот, локализованных на длинных некодирующих РНК. Интегрированный анализ идентифицированных КОРС, включающий анализ эволюционной консервативности среди 10 видов растений, анализ экспрессии и трансляции КОРС

генов, позволил выявить потенциально функциональные КОРС. Среди этих КОРС нами были выбраны три, кодирующие 41 а. (пеп1), 65 а. (пеп25) и 57 а. (пеп3) пептиды. Биологическое значение и функция данных пептидов были исследованы с помощью редактирования соответствующих КОРС в геноме мха.

Материал и методы. Для получения нокаутных форм мха по трем КОРС в отдельности нами использована система CRISPR-Cas9 редактирования для делетирования нескольких нуклеотидов вблизи старт-кодона и сдвига самой рамки считывания. Для этого была проведена трансформация протопластов мха, тремя плазмидами, кодирующими (1) фермент Cas9, (2) направляющую РНК (sgRNA) и плазмиду (3) несущую ген устойчивости растений к G418. Протопласты получали обработкой протонемы мха 0,5%-ным раствором драйзелазы в течение 1 ч. Трансформация 0,7 млн. протопластов проходила в присутствии полиэтиленгликоля и 5 мкг каждой плазмиды. Регенерацию растений осуществляли на селективной среде Кнопа с модификациями. Отобранные штаммы идентифицировали на наличие делеции секвенированием соответствующего участка. Для сверхэкспрессированных линий использовали аналогичную методику трансформации, но с плазмидами, кодирующими пептид под 35S промотором.

Результаты исследования. Результаты экспериментов показали высокую эффективность редактирования коротких рамок, поскольку удалось показать делеции во всех отобранных растениях после трансформации и отбора на селективной среде. Идентифицировано от 9 до 27 клонов по каждой из трех коротких рамок считывания. Для дальнейшего поиска функций пептидов было отобрано несколько штаммов для морфологической оценки роста и развития растений на различных питательных средах. Все линии, в которых трансляция соответствующего пептида нарушена, показали различные морфологические изменения. Сверхэкспрессированные линии удалось получить только для пеп1, которые характеризовались обильным образованием каулинемных нитей в протонеме и быстрым ростом колоний. По двум другим рамкам получить аналогичные линии не удалось.

Обсуждение. Высокая эффективность CRISPR-Cas9 редактирования в проведенных экспериментах позволила создать популяции нокаутных линий по трем коротким рамкам считывания. Полученные данные по достоверным изменениям в фенотипах растений мха при удалении КОРС свидетельствуют о биологической функции КОРС пептидов. Кроме того, неудачные попытки получения сверхэкспрессии пеп3 и пеп25 говорят о возможном летальном эффекте их сверхэкспрессии и исключительной роли в процессах развития целого растения. Для подтверждения функциональной значимости исследуемых пептидов, необходимо создание штаммов с индуцибельными системами экспрессии пептидов, определение локализации этих пептидов в клетке и в тканях целого растения, идентификация возможных партнеров среди белок-пептидных взаимодействий с последующими доказательствами. Эти работы ведутся в данное время.

Выводы. Система CRISPR-Cas9 редактирования на модельном объекте *Physcomitrella patens* является быстрой и высокоэффективной для поиска функционально значимых открытых рамок считывания.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-14-01189.

УД17

А.Н. Кораблев^{1,2}, И.Е. Пристяжнюк^{1,2},
Ю.М. Минина^{1,2}, И.А. Серова¹,
В.С. Фишман², Т.С. Рождественский³,
Л. Губарь³, Б.В. Скрябин³, О.Л. Серов^{1,2}

ПОЛУЧЕНИЕ МЫШЕЙ С ХРОМОСОМНЫМИ ПЕРЕСТРОЙКАМИ ГЕНА *CNTN6* ПРИ ПОМОЩИ CRISPR/CAS9 ТЕХНОЛОГИИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² НИИ медицинской генетики Томского национального медицинского центра РАН, Томск, Россия

³ Медицинский факультет, Core Facility Transgenic animal and genetic engineering Models (TRAM), Университет Мюнстера, Мюнстер, Германия

A.N. Korablev^{1,2}, I.E. Pristyazhnyuk^{1,2},
Y.M. Minina^{1,2}, I.A. Serova¹, V.S. Fishman¹,
T.S. Rozhdestvensky³, L. Gubar³, B.V. Stryabin³,
O.L. Serov^{1,2}

GENERATION OF MICE WITH CHROMOSOME ABERRATIONS OF THE *CNTN6* GENE BY USE OF CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY AND THEIR CHARACTERISTICS

¹ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

³ Medical Faculty, Core Facility Transgenic animal and genetic engineering Models (TRAM), University of Münster, Münster, Germany

korablev@bionet.nsc.ru

Введение. Прителомерный район короткого плеча 3 хромосомы (3p26.3) содержит три гена, относящихся к иммуноглобулиновому суперсемейству: *CHL1*, *CNTN6* и *CNTN4*. Делеции или дупликации этого района, затрагивающие только ген *CNTN6*, являются причинами развития заболеваний аутистического спектра, эпилепсии, умственной отсталости и задержки развития. Важно отметить, что разные, по своей сути перестройки нередко вызывают сходную клиническую симптоматику.

Интересно, что точковые мутации этого гена у человека (миссенс, нонсенс, мутации сайта сплайсинга, разрушение старт или стоп кодонов) не приводят к развитию заболеваний. Важно отметить, что, нокаут гена *Cntn6* у мышей в гомозиготном состоянии проявляется в виде незначительного снижения моторной координации, но не сопровождается нейропатологией подобной наблюдаемой у человека.

У мышей гены *Chl1*, *Cntn6*, *Cntn4* локализованы на 6 хромосоме в позициях 103,510,581–106,700,141 (GRCm38/mm10). Данные факты наличия серьезных клинических проявлений при хромосомных перестройках гена *CNTN6* у человека и отсутствие патологий при точковых мутациях, а также незначительные эффекты нокаута в гомозиготном состоянии гена *Cntn6* у мышей послужили причиной для получения мышей с масштабными перестройками, затрагивающие ген *Cntn6*. Предполагается, что такие животные могут быть адекватной экспериментальной моделью исследования нейропатологий, вызванных хромосомными перестройками, затрагивающие ген *Cntn6*.

Материал и методы. В работе применена техника микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 (mRNA-Cas9, gRNA, ssODN) в цитоплазму зигот мышей и с последующей их трансплантация суррогатным самкам. Генотипирование животных, резвившихся из экспериментальных зигот, проводили с помощью ПЦР и секвенирования продуктов ПЦР по Сенгеру. Для характеристики границ и судьбы делетированных фрагментов ДНК при хромосомных перестройках были использованы Саузерн-блот и FISH анализы с использованием набора ВАС клонов.

Результаты исследования. При получении хромосомных перестроек (делеций, дупликаций и инверсий) гена *Cntn6* размером 1,37 т.п.о. была использована CRISPR/Cas9 технология. Мы наблюдали рождение 41 животного из 599 трансплантированных экспериментальных зигот и при их генотипировании было выявлено 11 животных, которые имели целевые перестройки региона на 6 хромосоме, содержащих полноразмерный ген *Cntn6*: 5 имели делеции, 2 несли одновременно делецию и дупликацию и 4 были носителями инверсий. Важно отметить, что три делеции возникли в результате гомологичной рекомбинации, а другие четыре негомологичной рекомбинации. Наследование всех идентифицированных хромосомных перестроек исследовалось в течении 4–5 поколений.

При проведении Саузерн-блот анализа были использованы потомки от 7-ми основателей-линий, несущих делецию размером 1,37 т.п.о. Результаты этого анализа, показали присутствие ожидаемого размера фрагментов ДНК между сайтами EcoRV рестриктазы справа и слева от места соединения концов, возникших от целевой делеции, что свидетельствует о корректности примененной схемы CRISPR/Cas9 технологии.

Для проведения FISH анализа были получены первичные линии фибробластов от всех 11 основателей. В результате FISH анализа 7 линий животных, несущих делеции, было показано отсутствие транслокаций делетируемого фрагмента ДНК при использовании CRISPR/Cas9 технологии. Полученные данные свидетельствуют о высокой корректности этой технологии при генерировании индуцированных целевых делеций.

Обсуждение. Полученные данные противоречат недавно опубликованным данным, согласно которым при получении хромосомных перестроек в зиготах с помощью CRISPR/Cas9 технологии, возникают нежелательные нецелевые перестройки. Более того предполагается, что ПЦР и секвенирование ее продуктов в сайтах формирования новых контактов ДНК недостаточны для идентификации целевых и нецелевых модификаций генома. Согласно наших данных, при генерировании масштабных делеций в 3-х случаях из 7, установление контактов отдаленных фрагментов ДНК происходит на основе гомологичной рекомбинации, делетированные крупные фрагменты ДНК у 7-ми основателей элиминируется из генома, поскольку отсутствуют признаки их транслокаций (размером более 5 kb) на другие хромосомы.

Выводы. Использование CRISPR/Cas9 технологии на зиготах мышей позволяет с высокой эффективностью получать животных-носителей целевых масштабных хромосомных перестроек (делеции, дупликации и инверсии) перспективных для использования их в качестве моделей «хромосомных патологий» человека

В сравнении с ранее разработанной Cre/LoxP технологией, применяемой на эмбриональных стволовых клетках мыши с последующим созданием (посредством микроинъекции таких клеток в бластоцисты) химерных

и их потомков носителей целевых хромосомных перестроек, CRISPR/Cas9 технология позволяет получать животных с существенно меньшими временными затратами.

Исследование проведено при финансовой поддержке РНФ проект № 14-15-00772).

УД18

А.В. Кузьменко¹, Д.А. Юдин^{1,2},
Е.В. Кропачева¹, А.В. Олина¹, А.А. Котов¹,
С.С. Рязанский¹, Д.М. Есюнина¹,
А.А. Аравин³, А.В. Кульбачинский^{1,2}

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

¹ Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия

² Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, USA

A.V. Kuzmenko¹, D.A. Yudin^{1,2}, E.V. Kropacheva¹,
A.V. Olina¹, A.A. Kotov¹, S.S. Ryazansky¹,
D.M. Esyunina¹, A.A. Aravin³, A.V. Kulbachinskiy^{1,2}

BACTERIAL ARGONAUTE PROTEINS AS POTENTIAL TOOLS FOR GENOME EDITING

¹ Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Department of Molecular Biology, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, USA

akulb@img.ras.ru

Белки-Аргонавты — ключевые участники процессов РНК-интерференции у эукариот. Эти белки формируют комплексы с малыми РНК и узнают комплементарные им РНК-мишени. В зависимости от конкретного механизма РНК-интерференции, это может приводить либо к подавлению транскрипции, либо к подавлению трансляции, либо к разрезанию и последующей деградации РНК-мишени. Таким образом клетка способна противостоять вторжению чужеродных нуклеиновых кислот, а также регулировать экспрессию своих собственных генов. Главную роль в разрезании молекул-мишеней играют белки-Аргонавты, которые содержат нуклеазный центр, гомологичный РНКазе H. Исследования последних лет показали, что представители данного семейства белков есть и среди бактерий, причем, как и в случае эукариот, они могут участвовать в защите геномов от чужеродных генетических элементов. Оказалось, что прокариотические Аргонавты могут функционировать в отсутствие дополнительных факторов и при этом узнают не РНК, а ДНК-мишени. Это делает их перспективным инструментом для геномного редактирования. Однако, все имеющиеся на сегодня данные получены на примере всего нескольких Аргонавтов из термофильных микроорганизмов, в то время как механизмы действия и клеточные

функции подавляющего большинства прокариотических белков-Аргонавтов остаются неизвестными.

С помощью биоинформатического анализа геномных баз данных мы идентифицировали более 800 прокариотических белков-Аргонавтов разных классов, в том числе, каталитически активные Аргонавты из мезофильных бактерий. Свойства нескольких белков были исследованы в системах *in vivo* и *in vitro*. Показано, что данные белки при экспрессии в клетках *Escherichia coli* ассоциированы с молекулами коротких ДНК и не связываются с РНК. Получены очищенные препараты активных белков-Аргонавтов, установлено, что они являются ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами. Показано, что эффективность разрезания ДНК-мишеней зависит от структуры геновой ДНК, типа двухвалентного катиона и ионной силы раствора. В отличие от ранее изученных белков термофильных микроорганизмов, полученные белки способны осуществлять высокоспецифичное узнавание и разрезание мишеней в физиологическом диапазоне температур. Такие свойства позволяют использовать их для направленного редактирования геномной ДНК в эукариотических клетках.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации 14.WO3.31.0007.

УД19

В.А. Кузьмина¹, А.Ю. Борисенко²,
Ю.П. Джигоев², Н.П. Перетолчина²,
В.И. Степаненко², Ю.А. Землянская²,
Н.А. Арефьева¹, В.П. Саловарова¹,
А.А. Приставка¹, Г.В. Юринова¹, В.И. Злобин²

СТРУКТУРА CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ В ГЕНОМЕ ШТАММА STAPHYLOCOCCUS AUREUS TW20 И СПЕКТР ИДЕНТИФИЦИРУЕМЫХ CRISPR-КАССЕТЫ ФАГОВЫХ РАС

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск, Россия

V.A. Kuzminova¹, A.Yu. Borisenko², Yu.P. Dzhigoev²,
N.P. Peretolchina², V.I. Stepanenko²,
Yu.A. Zemlyanskaya², N.A. Arefieva¹,
V.P. Salovarova¹, A.A. Pristavka¹, G.V. Yurina¹,
V.I. Zlobin²

STRUCTURE OF CRISPR/CAS SYSTEMS IN THE GENOME SYSTEMS IN THE GENOME STRAIN STAPHYLOCOCCUS AUREUS TW20 AND SPECTRUM OF PHAGES RAS IDENTIFIED BY CRISPR-CASSETTE

¹ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

ewwwrye@gmail.com

Введение. Сегодня стафилококковые инфекции остаются серьезной проблемой для практической медицины, а их представитель — *Staphylococcus aureus* из-за своей множественной антибиотикоустойчивости стоит в «первых рядах» [1]. Поэтому, становится необходимостью поиск новых инновационных подходов и методов для борьбы с этой проблемой. Одним

из таких инновационных подходов являются технологии, основанные на особенностях CRISPR/Cas-систем бактерий, открытие недавно. CRISPR/Cas-система для бактерий служит защитным «инструментом» от фагов и плазмид. Современные методы биоинформатики позволяют выявлять в геномах штаммов бактерий сайты CRISPR/Cas-систем и через спейсеры их CRISPR-кассет определять профили фаговых и плазмидных комплексов, с которыми данная бактерия или ее предки встречались за свою эволюционную историю.

Цель. Разработка алгоритма программных методов для поиска и анализа разнообразия структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus*, их спейсеров в обнаруженных CRISPR-касетах и идентифицируемых через них спектров фаговых рас.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовался геном штамма *Staphylococcus aureus* TW20, загруженный из базы данных GenBank (NC_017331.1). Для поиска CRISPR/Cas — систем использовался программный метод MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver.1.0.2) [3]. Для фиксации CRISPR-кассет в геноме бактерий были использованы три алгоритма поиска: 1) «CRISPRDetect: a tool to predict and analyze CRISPR arrays», 2) CRISPI: a CRISPR Interactive database, 3) CRISPRFinder. С помощью программного алгоритма возможно осуществить последовательный поиск CRISPR-кассет, выявить структуры повторов и спейсеров, а также визуализировать их. Поиск фагов через комплементарные их протоспейсерам спейсерные последовательности CRISPR-касеты проводили с помощью алгоритма поиска BLASTn по базе данных GenBank-Phage. Для этого были использованы онлайн-приложение «CRISPRTarget: a tool to explore targets of CRISPR RNAs», а также Mycobacteriophage Database и Phages database [2, 4].

Результаты исследования и обсуждение. В результате исследования было выяснено, что CRISPR/Cas-система *S. aureus* относится к III-A типу. Удалось обнаружить гены белков, обслуживающих действие CRISPR/Cas — системы: 4 гена *cas*-белков (*cas1*, *cas2*, *cas6*, *cas10*) и 3 *csm*-белков (*csm2*, *csm3*, *csm6*). В CRISPR-кассете штамма количество спейсерных участков составило 8. Спейсеры размером от 32 до 36 н.о., разделенные повторами длиной 22 н.о. Через структуры спейсеров CRISPR-кассет *S. aureus* и комплементарных им протоспейсерам были идентифицированы следующие бактериофаги: *Mycobacterium phage*, *Gordonia phage*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Legionella pneumophila*.

В результате анализа спейсеров, которые соответствуют протоспейсерам данных фагов, можно оценить степень генетической защищенности данного штамма от бактериофагов.

Выводы. Комбинирование известных в настоящее время программных методов поиска и расшифровки CRISPR/Cas — систем позволяющее более точно определить их структурно-функциональные характеристики, а также их способность выявлять фаговые расы, с которыми данные виды встречались за свою эволюционную историю. В перспективе данный подход позволит создать платформу для разработки технологии штаммоспецифичной фаговой терапии инфекции, вызываемых патогенными видами бактерий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 17-415-380005.

Литература:

1. Романов А.В., Чернов Е.А., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России. Молекулярная медицина 2013; 4: 55–64.
2. Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S. et al. CRISPRTarget Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. RNA Biol. 2013; 10 (5): 817–27.
3. Benda C., Ebert J., Scheltens R.A. et al. Structural model of a CRISPR RNA-silencing complex reveals the RNA-target cleavage activity in Cmr4. Mol. Cell 2014; 56: 43–54.
4. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012; 337: 816–21.

УД20

С.В. Кулемзин, А.А. Князева, А.С. Смагина, Т.Н. Беловежец, А.А. Горчаков, А.В. Таранин ПОЛУЧЕНИЕ НК-КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

*Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН, Новосибирск, Россия*

*S.V. Kulemzin, A.A. Knyazeva, A.S. Smagina,
T.N. Belovezhec, A.A. Gorchakov, A.V. Taranin*

GENERATION OF NK-CELL LINES WITH ENHANCED THERAPEUTIC POTENTIAL

*Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk,
Russia*

skulemzin@mcb.nsc.ru

Введение. Одним из многообещающих агентов в области иммунотерапии рака являются НК-клетки. Клинические испытания с использованием аллогенных НК-клеток для терапии ряда онкозаболеваний показали умеренную эффективность этого подхода [1]. Кроме того, проводились испытания линейных НК-клеток линии NK-92, которые обнаружили полную безопасность введения облученных клеток NK-92 в высоких дозах, однако не продемонстрировали эффективности [2]. По-видимому НК-клетки в этих случаях недостаточно активировались при взаимодействии с клетками-мишенями. Чтобы улучшить активационные и цитотоксические свойства НК-клеток, мы предлагаем проводить геномное редактирование, удаляя гены-негативные регуляторы активации и внедряя кДНК проактивационных генов под конститутивными промоторами. Для усиления экспрессии в данной работе нами был выбран ген Vav1, а мишенью для нокаута мы выбрали ген beta-Arrestin 2 (ARRB2).

Материал и методы. В работе были использованы перерабатываемые НК-клеточные линии человека YT и NK-92, в качестве раковых клеток-мишеней использовали линию клеток аденокарциномы простаты человека PC3.

Для конститутивной экспрессии Vav1 кДНК этого гена была клонирована в лентивирусный вектор pCDH под контролем конститутивного промотора EF1a. При помощи полученного вектора были собраны лентивирусные частицы и проведена трансдукция клеток YT и NK-92. Уровень экспрессии Vav1 в модифицированных линиях был охарактеризован при помощи метода вестерн-блот. Цитотоксичность YT-Vav1 и NK92-Vav1 клеток по сравнению с родительскими клеточными линиями измеряли

в отношении клеток PC3 методом RTCA на платформе iCelligence.

Для создания клеток линии NK-92, нокаутных по гену ARRB2 были подобраны 3 gRNA к двум кодирующим и одному некодирующему району. Последовательности, кодирующие данные gRNA, были клонированы в лентивирусный вектор lentiCRISPRv2. Далее были получены лентивирусные частицы и проведена трансдукция клеток NK-92. Через 48 часов после трансдукции была начата селекция на пурамицине, которая продолжалась 5 суток. После селекции клетки были клонированы и индивидуальные клоны анализировали на наличие делеций. Если клон содержал делецию во всех аллелях гена, отсутствие белка верифицировали вестерн-блотом, а участок делеции картировали при помощи клонирования и секвенирования целевого локуса.

Результаты исследования. Нами были получены линии клеток YT-Vav1 и NK92-Vav1, конститутивно экспрессирующие белок Vav1 на значительно более высоком уровне, чем в родительских клетках. Цитотоксичность клеток YT-Vav1 в отношении клеток аденокарциномы простаты PC3 оказалась значительно выше, чем цитотоксичность клеток родительской линии. Более того, в отсутствие стимуляции клеток YT-Vav1 цитокинами она была сопоставима с цитотоксичностью первичных NK-клеток, стимулированных IL-2 и IL-15. Подобная высокая цитотоксическая активность может быть востребована для создания терапевтических противораковых клеток-эффекторов. В дальнейшем необходимо охарактеризовать безопасность этих клеток, определив их цитотоксичность в отношении нормальных клеток различных тканей и различных доноров.

Для проверки второго подхода — удаления гена негативного-регулятора нами были получены нокаутные клетки NK92-ARRB2-/- . Необходимо отметить, что работа по редактированию линии NK-92 оказалась осложнена тем фактом, что эти клетки гипотетраплоидные, соответственно, для получения полного нокаута нужно произвести делецию в трех-четырех участках генома. В настоящее время ведется работа по изучению активационных и противораковых свойств полученных нокаутных линий.

Обсуждение. Все большее внимание исследователями разных групп уделяется подходу клеточной терапии «off-the-shelf», при котором эффекторные клетки универсальны и не производятся индивидуально для каждого пациента, а стандартизованы и всегда в наличии для быстрого начала лечения. Нами ведутся работы по модификации NK-клеток с целью придания им улучшенных терапевтических свойств с сохранением должного уровня безопасности. Предварительные результаты свидетельствуют о возможности увеличивать цитотоксическую активность NK-клеток путем модификации их генома.

Выводы. Оверэкспрессия кДНК гена Vav1 в NK-клетках человека приводит к увеличению их противоопухолевой активности in vitro. Необходимо дальнейшее развитие подходов модификации NK-клеток для создания оптимального терапевтического агента.

Работа была поддержана грантом РФФИ 17-04-02044A.

Литература:

1. Geller M.A., Miller J.S. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunother.* 2011; 3(12):1445–59.
2. Tonn T., Schwabe D., Klingemann H.G. et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytother.* 2013; 15(12):1563–70.

УД21

А.В. Лавров^{1,2}, Г.Г. Вареников³,
Е.В. Кондратьева¹, М.Ю. Скоблов^{1,3}

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ПОЗВОЛЯЕТ КОРРЕКТИРОВАТЬ СОТНИ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

A.V. Lavrov^{1,2}, G.G. Varenikov³, E.V. Kondratyeva¹,
M. Yu Skoblov^{1,3}

TARGETED SINGLE NUCLEOTIDE EDITING ALLOWS CORRECTION OF HUNDREDS OF PATHOGENIC VARIANTS IN HEREDITARY DISEASES

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

ekaterina.kondratyeva@gmail.com

Введение. Недавно были разработаны новые инструменты на основе CRISPR/Cas9. Вкратце, нуклеотидные деаминазы (nucleotide deaminases, ND), слитые с dCas9, делают возможным направленное превращение C(G) в T(A) и A(T) в G(C) без введения двухцепочечных разрывов. Это означает, что при наследственных заболеваниях может быть исправлено четыре типа мутаций: T>C, A>G, C>T, G>A. Однако ND активны в окне, состоящем из нескольких нуклеотидов, что ограничивает их потенциальное использование. Для поиска оптимальных мишеней для применения однонуклеотидного редактирования в клинической практике был проведен биоинформатический и экспертный анализ известных мутаций.

Материал и методы. С помощью базы данных ClinVar получали все известные патогенные мутации. Нуклеотиды, окружающие каждую мутацию, анализировали на наличие PAM-последовательностей и отсутствие других нуклеотидов, которые неспецифически могут быть изменены под влиянием ND.

Результаты исследования. Мы провели анализ всех вариантов, зарегистрированных в ClinVar, и обнаружили, что 55989 замен T(A)>C(G) составляют 19% от всех записей, а 124687 замен C(G)>T(A) составляют еще 41%. Только 6550 (11,7%) и 18357 (15,5%) из них были классифицированы как патогенные. Для 3744 мутаций T(A)>C(G) и 5550 мутаций C(G)>T(A) была найдена PAM-последовательность для Cas9 (NGG для spCas9 и TTTV для Crpf1), что делает возможной их таргетное дезаминирование. Так как деаминаза активна в окнах длиной от 6 до 8 нуклеотидов для разных комбинаций ND и Cas9, то важно выбрать только те мутации, которые могут быть специфически отредактированы без изменения соседних нуклеотидов. Всего было найдено 920 мутаций T(A)>C(G) и 1959 мутаций G(C)>A(T), на которые может быть нацелена dCas9-деаминаза с целью однонуклеотидного редактирования.

Созданная база мутаций A>G для редактирования с помощью системы pCas9(D10A)-PmCDA1 (344 мутации из 920) далее была проанализирована вручную. Для анализа отбирали только мутации, отмеченные в базе ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) как патогенные. Далее анализировали ссылки на отобранные мутации в базе ClinVar, а также проводили поиск отобранных мутаций в базах OMIM® (<https://www.omim.org/>) и HGMD® [1] с последующим анализом приведенных статей. Анализ заключался в оценке степени доказанности патогенности мутации. Другим параметром для анализа мутаций была частота встречаемости конкретной мутации среди больных. В итоге были отобраны три мутации, патогенность которых доказана, и которые описаны у групп больных, а не в единичных случаях.

Обсуждение. Гомозиготная мутация 740A>G, приводящая к замене аминокислоты (Asn247Ser) в гене KERA, который кодирует кератокан, является причиной одной из форм плоской роговицы, аутосомного рецессивного заболевания, которое является очень редким в мире, но распространено в северо-восточной Финляндии [2]. Все исследованные пациенты (46 человек) с плоской роговицей в Финляндии являются носителями данной мутации, и она включена в базу Финских наследственных заболеваний [3]. Учитывая современные тенденции регенеративной медицины к лечению заболеваний роговицы с использованием клеток-предшественников пациента [4], теоретически подход редактирования мутаций может быть успешно применен в будущем при данном заболевании.

Мутация Y111C в гене KCNQ1 (ген калиевого канала сердца) вызывает значительное снижение входящего калиевого тока через мембрану клеток *in vitro* [5] и ассоциирована с синдромом удлиненного интервала QT у человека [6]. Пациенты с этим синдромом имеют высокий риск развития синкопе. Как правило, при своевременном диагностировании и лечении прогноз хороший, но встречаются злокачественные формы. Данная мутация распространена в Швеции и была выявлена у 80 пациентов [6].

Мутация в некодирующей части (-26+2T>C) гена SLC26A2 (кодирует переносчик сульфат-ионов) вызывает аутосомно-рецессивную дистрофическую дисплазию, которая проявляется внутриутробной задержкой развития и деформацией опорно-двигательного аппарата [7]. Данная мутация значительно преобладает в Финляндии, где ее носительство составляет 1–2 %, а данное заболевание является одним из наиболее распространенных рецессивных заболеваний в стране [8, 7].

Выводы. Перечень 2879 патогенных вариантов, зарегистрированных в ClinVar, представляет собой ценный инструмент для поиска перспективных мишеней для целенаправленного прямого редактирования ДНК с помощью инструментов на основе dCas9-деаминаз.

Литература:

1. Stenson P.D., Ball E.V., Mort M. et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003; 21(6): 577–81.
2. Pellegata N.S., Dieguez-Lucena J.L., Joensuu T. et al. Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. *Nat. Genet.* 2000; 25(1): 91–5.
3. Sipilä K., Aula P. Database for the mutations of the Finnish disease heritage. *Hum. Mutat.* 2002; 19(1): 16–22.
4. Mimura T., Tabata Y. and Amano S. Transplantation of Corneal Stroma Reconstructed with Gelatin and Multipotent Precursor Cells from Corneal Stroma. In: Eberli D., editor. *Tissue*

Engineering for Tissue and Organ Regeneration. IntechOpen; 2011: 47–62.

5. Jespersen T., Rasmussen H.B., Grunnet M. et al. Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 4517–26.
6. Winbo A., Diamant U.B., Rydberg A. et al. Origin of the Swedish long QT syndrome Y111C/KCNQ1 founder mutation. *Heart Rhythm* 2011; 8(4): 541–7.
7. Bonafe L., Hästbacka J., de la Chapelle A. et al. A novel mutation in the sulfate transporter gene SLC26A2 (DTDST) specific to the Finnish population causes de la Chapelle dysplasia. *J. Med. Genet.* 2008; 45(12): 827–31.
8. Hästbacka J., Salonen R., Laurila P. et al. Prenatal diagnosis of diastrophic dysplasia with polymorphic DNA markers. *J. Med. Genet.* 1993; 30(4): 265–8.

UD22

Д.В. Мазуров^{1,2}

НОВЫЙ МЕТОД СЕЛЕКЦИИ РЕДАКТИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ НОКИНА КОРОТКИХ GPI-ЗАЯКОРЕННЫХ ЭПИТОПНЫХ ТАГОВ.

¹ Группа Клеточных и Генных Технологий, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

² Лаборатория иммунохимии, ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

D.V. Mazurov^{1,2}

A NOVEL METHOD OF GENE-EDITED CELL SELECTION VIA KNOCKIN OF SHORT GPI-ANCHORED EPITOPE TAGS.

¹ Cell and Gene Technology Group, Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

² NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russia

dvmazurov@yandex.ru

Введение. Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 и других программируемых нуклеаз требует последующую селекцию клеток, в которых желаемое изменение гена (нокаут или нокин) произошло. Для этого используют клонирование, возможное не для всех клеток, нокин селекционного маркера, требующий конструирование донорского вектора, или окрашивание антителами и сортировку клеток. Первые два метода используются для селекции нокаутов по внутриклеточным и секретируемым белкам, тогда как последний — для нокаута поверхностных белков. Преимуществом сортировки является то, что выделенная поликлональная популяция клеток накапливает наименьшее число внецелостных повреждений генома и функционально более пригодна [1]. Мы создали новый метод селекции редактированных клеток на основе короткого GPI-заякоренного белка CD52, позволяющий по экспрессии встроенных в него эпитопных тегов Flag и HA отсортировать живые клетки с биаллельным нокином.

Материал и методы. Нами созданы две экспрессионные плазмиды pCMV-CD5Flag2 и pCMV-CD5HA2, где ген человека CD52 был модифицирован эпитопным тегом, а SV40 терминатор транскрипции заменен на более короткий. Эффективность экспрессии и доставки эпитопов на поверхность клетки оценивали на клетках человека HEK 293T во временной трансфекции

методами проточной цитометрии и флуоресцентной деконволюционной микроскопии после окраски анти-телами. Наилучшие конструкции использовали в ПЦР как матрицу для генерации донорской ДНК без промотора, при этом плечи гомологии длиной ~100 нт закладывали в синтетические праймеры. Подбор целевых последовательностей для гидовых РНК (gRNA) и клонирование их в плазмиду осуществляли по методике, ранее описанной [2]. Нокин инициировали путем котрансфекции донорской ДНК и двух плазмид для экспрессии gRNA и Cas9 и оценивали через 3 дня по количеству таг-позитивных клеток. При необходимости эти клетки сортировали на приборе FACS Aria II, а эффективность нокаута гена-мишени оценивали методом вестерн-блота.

Результаты исследования. Результаты экспериментов по временной трансфекции показали, что созданные конструкции обеспечивали доставку эпитопов Flag и HA на поверхность клетки не хуже, чем нативный CD52. Сигнал терминации транскрипции из гена глобина человека оказался наиболее коротким и в тоже время эффективным. Уровень нокина полученной конструкции в различные гены человека (GAPDH, CD59, VDAC1 и VDAC3) варьировал от 1 до 15% и превышал уровень нокина гена GFP в 5 раз. Пул клеток с моноаллельным нокином, т.е. сортированных по одному из тагов, имел практически полный (VDAC1 и 3), либо неполный (CD59) нокаут. При нокине двух доноров и сортировке по двум маркерам всегда получались клетки с полным нокаутом. Экспрессия маркерных эпитопов в результате нокина была стабильной и не менялась на протяжении всего времени пересева клеток.

Обсуждение. Благодаря сохранению сайтов N-гликозилирования в молекуле CD52 и замены аминокислот в той части молекулы, которая после процессинга экспортируется на поверхность клетки, нам удалось добиться высокого уровня экспрессии созданных конструкций. Разнообразие уровня нокина в различные гены может быть объяснено различиями в уровнях активности gRNA, гомологичной рекомбинации, состоянии хроматина и пр., а 5-кратное превышение нокина GPI-конструкции в сравнении с GFP тем, что длина ее была более, чем в 2 раза короче традиционных репортерных генов. Логичным было то, что биаллельный нокин полностью выключал ген, несмотря на гипотриплоидность клеток 293T, однако клетки, сортированные по одному тагу, в большинстве оказывались также нокаутными. Это можно объяснить тем, что либо эпитоп интегрировался в оба аллеля, либо второй аллель был инактивирован в результате делеций/вставок (более вероятно).

Выводы. Создан метод, позволяющий быстро, с помощью сортировки по двум эпитопным тагам, выделять живые клетки с полным нокаутом. Он пригоден для селекции нокаутов по внутриклеточным или экспортируемым белкам и не требует конструирования донорского вектора.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда [грант № 18-04-00333].

Литература:

1. Zotova A., Lopatukhina E., Filatov A. et al. Gene editing in human lymphoid cells: role for donor DNA, type of genomic nuclease and cell selection method. *Viruses* 2017; 9(11): E325.
2. Tarasevich A., Filatov A., Pichugin A. et al. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta virologica* 2015; 59(3): 247–56.

УД23

Т.Б. Маланханова¹⁻⁴, А.К. Сурумбаева^{1,3,4},
Е.В. Григорьева¹⁻⁴, А.А. Малахова¹⁻⁴,
С.М. Закиян¹⁻⁴

МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА НА ОСНОВЕ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ ИПСК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR/CAS9

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский
центр имени академика Е.Н. Мешалкина,
Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, Новосибирск,
Россия

T.B. Malankhanova¹⁻⁴, A.K. Surumbayeva^{1,3,4},
E.V. Grigor'eva¹⁻⁴, A.A. Malakhova¹⁻⁴, S.M. Zakian¹⁻⁴

HUNTINGTON'S DISEASE MODELING BASED ON ISOGENIC IPSC LINES USING CRISPR/CAS9

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and
Genetics, Siberian Branch of Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine, Siberian Branch of Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Center
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

tbmalankhanova@gmail.com

Введение. Возможность эффективного внесения модификаций позволила вносить и исправлять мутации практически в любой локус генома, и таким образом создавать изогенные клеточные модели заболеваний. Изогенные линии клеток отличаются друг от друга только наличием или отсутствием мутации, вызывающей заболевание, что позволяет избежать влияния генетического фона на результаты исследований. Такой подход может быть использован при исследовании наследственных нейродегенеративных заболеваний. Одним из таких заболеваний является болезнь Гентингтона (БГ), вызванная экспансией повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*. Мутация была выявлена в 1993 году и ведутся многочисленные исследования данной патологии, однако, все еще неизвестны молекулярные механизмы заболевания и нет эффективных способов лечения [1]. Создание изогенной клеточной модели БГ с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации (ГР) является перспективным подходом для разработки релевантной платформы для изучения БГ и скрининга лекарственных препаратов.

Материал и методы. Плазмида, экспрессирующая компоненты CRISPR/Cas9, и донорный вектор были получены с помощью методов молекулярного клонирования. Плазмиды были доставлены в эмбриональные фибробласты человека с помощью Neon Transfection System. GFP-позитивные клетки были отобраны с помощью сортирования. Клоны отдельных клеток были проанализированы с помощью ПЦР на наличие целевой мутации,

которая в дальнейшем была подтверждена с помощью секвенирования по Сэнгеру. Перепрограммирование было проведено с помощью эписом, экспрессирующих факторы плюрипотентности. Полученные линии ИПСК были охарактеризованы с помощью стандартных тестов на плюрипотентность. Экспрессия mHTT была исследована с помощью Вестерн-блот анализа.

Результаты исследования. Получено более 600 клонов единичных клеток. Все клоны были проанализированы на наличие целевой встройки, из которых 27 клонов содержали встройку нужной длины. Точность встройки мутации была подтверждена в 2 клонах из 3, взятых в анализ. Кроме того, было выявлено, что первый клон содержал 39 повторов CAG (39Q), второй — 69 (69Q). Далее оба клон клеток были перепрограммированы, получено 21 и 32 первичных клонов ИПСК соответственно. Далее все клоны были повторно исследованы на наличие целевой встройки, в результате чего было отобрано только 2 клон 39Q и 10 клонов 69Q. При стандартной характеристике ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентных стволовых клеток, давали производные трех примитивных зародышевых листков и имели нормальный кариотип. С помощью Вестерн-блот анализа была подтверждена экспрессия mHTT.

Обсуждение. Эффективность ГР в среднем составляет 10^{-4} – 10^{-3} без использования CRISPR/Cas9 [2]. Эффективность гомологичной рекомбинации в локусе HTT в фибробластах составила около 5%, что является показателем высокой активности CRISPR/Cas9 в данном локусе. Встройка повторов разной длины свидетельствует о том, что гомологичная рекомбинация проходит не точно по плечам гомологии, CAG-повторы могут служить в качестве плеча гомологии. Экспрессия мутантного белка указывает на корректную встройку повторов. Это свидетельствует, что получена изогенная клеточная модель болезни Гентингтона на основе ИПСК.

Выводы. Получены изогенные линии ИПСК, несущие 39 и 69 повторов CAG в первом экзоне гена HTT, с помощью гомологичной рекомбинации и CRISPR/Cas9. По результатам Вестерн-блот анализа была показана экспрессия хантингтина с удлинённым полиглутаминовым трактом в мутантных клетках.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10128.

Литература:

1. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993; 72(6): 971–83.
2. Kuzminov A. Homologous Recombination—Experimental Systems, Analysis and Significance. *EcoSal Plus* 2011; 4(2). doi: 10.1128/ecosalplus.7.2.6.

УД24

Е. Павлова¹, А. Морозов²,
Д. Паэс-Эспино³, И. Белалов^{4,5}

СТЕПЕННОЙ ЗАКОН РАСПРЕДЕЛЕНИЯ CRISPR-CAS СИСТЕМ

¹ Департамент математики Колледжа Паломар,
Калифорния, США

² Департамент математики Университета Лестера,
Лестер, Великобритания

³ Объединенный геномный институт министерства
энергетики США

⁴ Институт микробиологии им Виноградского, ФИЦ
Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁵ Механико-математический факультет МГУ,
Москва, Россия

Ye. Pavlova¹, A. Morozov², D. Paez-Espino³,
I. Belalov^{4,5}

THE POWER LAW OF CRISPR-CAS SYSTEMS

¹ Palomar College, Mathematics Department, USA

² Department of Mathematics, University of Leicester,
Leicester, United Kingdom

³ Department of Energy, Joint Genome Institute, USA

⁴ Winogradsky Institute of Microbiology, Research
Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

⁵ Faculty of Mechanics and Mathematics, Moscow
State University, Moscow, Russia

ilya.belalov@gmail.com

Введение. Система адаптивного иммунитета прокариот состоит из CRISPR-кассет и белков эффекторного и адапторного комплексов. Распознавание чужеродной ДНК осуществляется посредством комплементарного взаимодействия с РНК (крРНК) в составе эффекторного комплекса. При первой попытке инфекции клетки вирусом фрагмент его генома (протоспейсер) встраивается в CRISPR-кассету в геноме микроорганизма-хозяина (фаза адаптации). После транскрипции CRISPR-касеты и процессинга новосинтезированной РНК образуются крРНК комплементарные соответствующим последовательностям геномов вирусов. При повторной инфекции геном данного вируса распознается крРНК эффекторного комплекса и расщепляется (фаза интерференции).

В популяции вирусов всегда можно обнаружить варианты с мутациями протоспейсеров, позволяющими уйти от распознавания. Однако, наличие спейсера, частично комплементарного вирусному геному, стимулирует включение из него новых спейсеров в CRISPR-кассету. Наличие большого репертуара спейсеров распознающих, разные участки генома вируса, гарантирует выживание популяции микроорганизмов [3].

Материал и методы. Мы провели анализ 3858 метагеномов и 6214 полногеномных последовательностей прокариот. Для детекции CRISPR-кассет использовалась программа CRT [2]. Для обработки данных использовался пакет *powerlaw* [1], позволяющий надежно определять статистические распределения с «тяжелыми хвостами».

Мы также построили дискретную математическую модель на основе марковских цепей для объяснения наблюдаемого распределения.

Результаты исследования. На выборке в 3858 метагеномов (2189103 CRISPR-кассет и 11724296 спейсеров) мы установили, что статистическое распределение количества спейсеров в CRISPR-касетах подчиняется степенному закону распределения вероятностей

с экспоненциальным затуханием. Для того, чтобы исключить вероятность артефактов технологии метагеномного секвенирования и сборки контигов, мы проанализировали 6214 полногеномных последовательностей прокариот (101471 CRISPR-кассет, 439829 спейсеров) и установили, что наблюдаемое распределение подчиняется тому же закону.

Математическая модель, составленная нами на основе экспериментальных данных воспроизводит наблюдаемые распределения. Параметры математической модели при которых достигается совпадение наблюдаемых распределений и предсказаний модели подлежат экспериментальному подтверждению.

Обсуждение. Степенные законы распределения вероятностей обладают так называемыми «тяжелыми хвостами»: события, происходящие с низкой вероятностью вносят большой вклад в среднее значение по выборке. В случае спейсеров в CRISPR-кассетах тяжелые хвосты говорят о высокой вероятности существования микроорганизмов-хозяев, устойчивых ко множеству вирусов. Эти сверхиммунные клетки потенциально могут пережить инфекцию гораздо большим числом типов вирусов и стать прародителем новой популяции. В связи с негативным влиянием длинных CRISPR-кассет на приспособленность [4], клетки, утрачивающие спейсеры делятся чаще. В результате большинство CRISPR-кассет содержит менее 10 спейсеров. Таким образом в «динамику черной королевы» вовлекается менее иммунная, имеющая меньше спейсеров, часть бактериальных популяций. Это можно наблюдать как в изолированных экосистемах, так и в целых биомах, в масштабах континентов, океанов, и всей планеты.

Выводы.

1. Показано, что статистическое распределение спейсеров по CRISPR-кассетам подчиняется степенному закону распределения вероятностей с экспоненциальным затуханием.

2. На основе экспериментальных данных построена математическая модель, объясняющая наблюдаемые распределения.

Литература:

1. Alstott J., Bullmore E., Plenz D. Powerlaw: a Python package for analysis of heavy-tailed distributions. PLoS ONE 2014; 1(9): e85777.
2. Bland C., Ramsey T.L., Sabree F. et al. CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. BMC Bioinformatics 2007; 1(8): 209.
3. Hille F., Richter H., Wong S.P. et al. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. Cell 2018; 6 (172): 1239–59.
4. Westra E.R., S nderhauf D., Landsberger M. et al. Mechanisms and consequences of diversity-generating immune strategies. Nature Reviews Immunology 2017; 11 (17): 719–28.

УД25

К.Д. Рысенкова¹, Е.В. Семина^{1,2}, М.Н. Карагяур³,
А.А. Шмакова¹, К.А. Рубина¹, В.А. Ткачук^{1,2,3}

НОКАУТ ГЕНА УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА (PLAUR) С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ИНВАЗИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦК МЗ РФ, Москва, Россия

³ Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

K.D. Rysenkova¹, E.V. Semina^{1,2*}, M.N. Karagyaour³,
A.A. Shmakova¹, K.A. Rubina¹, V.A. Tkachuk^{1,2}

KNOCKOUT OF THE UROKINASE RECEPTOR GENE PLAUR BY CRISPR/CAS9 TO REDUCE THE PROLIFERATION AND INVASION OF NEUROBLASTOMA

¹ Faculty of Fundamental Medicine, MSU, Moscow, Russia

² Laboratory of molecular endocrinology, Institute of Experimental Cardiology Federal State budget organization National medical research center of cardiology of the Minzdrav of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Institute of Regenerative Medicine, MSU, Moscow, Russia

e-semina@yandex.ru

Введение. Нейробластома — это опухоль, возникающая из нейробластов в пренатальный период. По сравнению с другими опухолями ЦНС нейробластома обладает способностью к спонтанной регрессии [1, 2], однако молекулярные механизмы этого процесса неизвестны.

В зависимости от уровня экспрессии одного из рецепторов нейротрофинов TrkA, TrkB или TrkC, нейробластома подразделяется на два типа [3]. Так, экспрессия TrkA и TrkC коррелирует с повышенным уровнем апоптоза клеток опухоли [4], а экспрессия TrkB наоборот, свидетельствует о неблагоприятном исходе заболевания [5, 6].

Повышенная экспрессия урокиназы (uPA) и урокиназного рецептора (uPAR) характерна для высокоинвазивных форм нейробластом [7]. Описано несколько терапевтических подходов для снижения активности урокиназной системы в опухолях. Так, выделяют блокирование связывания uPA с uPAR с помощью антител, а также метод РНК-интерференции (siРНК) для снижения экспрессии PLAUR. Данные подходы показали свою эффективность в отношении глиом и глиобластом: использование siРНК против mРНК uPAR или блокирование uPAR приводило к снижению пролиферации и инвазии опухоли при одновременном снижении жизнеспособности клеток в культуре и васкуляризации опухолей [8, 9]. Несмотря на эффективность таких подходов, их применение ограничено кратковременностью действия метода siРНК и обратимостью эффекта блокирующих антител. Разработанный нами подход с использованием технологии CRISPR/Cas9 для нокаута PLAUR не имеет таких ограничений и позволяет изучать клеточные и молекулярные механизмы регуляции опухолевой прогрессии.

Материал и методы. Подбор последовательностей sgRNA, специфичных к *PLAUR*, проводили с помощью сервиса CRISPR/Cas9-MIT. Подробное описание протокола получения плазмидных конструкций и селекции uPAR-дефицитных клонов представлены в [10]. Полученными плазмидными конструкциями осуществляли три последовательные контранфекции линейных клеток нейробластомы мыши Neuro2a (ATCC® CCL-131™), далее проводили точную цитометрию для отбора трансфицированных клеток и получения клонов со стабильно сниженной экспрессией uPAR. Анализ содержания uPAR, фосфорилированных форм Akt и p38 в клонах проводили методом Вестерн блоттинга. Экспрессию мРНК TrkA, TrkB, а также общей, усеченной и полноразмерной формы TrkC оценивали методом ПЦР в реальном времени [11].

Для анализа инвазии клетки Neuro2a высаживали в концентрации 5×10^5 /мл в верхнюю камеру Transwell® (размер пор 8 мкм, Millipore); в нижнюю камеру вносили среду культивирования (DMEM), или DMEM с uPA (Abscam) в концентрации 50 нМ. Через 3 ч мембраны фиксировали, промигрировавшие клетки окрашивали набором красителей Diff-Quick. Пролиферацию клеток измеряли с использованием автоматического счетчика клеток Countess®.

Результаты исследования. Используя технологию CRISPR/Cas9 были получены клоны клеток Neuro2a с подавленной экспрессией uPAR. По сравнению с контрольными клетками (WT) пролиферация в двух отобранных клонах (6 и 30) через 72 ч снижалась на 66% и 81%, соответственно; через 96 ч разница между клонами 6 и 30 и WT составила 27% и 39%, соответственно; а через 120 ч — 57% и 67%, соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, подавление экспрессии uPAR достоверно снижает пролиферацию Neuro2a.

Известно, что uPA взаимодействуя с uPAR, стимулирует инвазию опухолей [9], мы обнаружили, что спонтанная миграция WT клеток значительно превышает миграцию в клонах 6 и 30. При этом введение uPA в DMEM в 5 раз стимулировало скорость инвазии WT клеток, а в случае клонов 6 и 30, скорость uPA-стимулированной инвазии не изменялась.

При изучении внутриклеточной сигнализации, которая может опосредовать uPAR-зависимые эффекты в Neuro2a, было обнаружено, что в клонах 6 и 30 экспрессия мРНК рецептора TrkC снижена по сравнению с экспрессией в WT клетках ($p < 0,05$); а экспрессия TrkB и TrkA не изменялась. Достоверной разницы в экспрессии мРНК усеченной формы TrkC в WT и клонах 6 и 30 обнаружено не было, однако наблюдалось 25% снижение экспрессии мРНК полноразмерной формы TrkC в клонах 6 и 30.

Снижение пролиферации и экспрессии мРНК TrkC в uPAR-дефицитных Neuro2a клетках по сравнению с WT сопровождалось изменением внутриклеточной сигнализации, регулирующей их пролиферацию. Так, было зарегистрировано 1,8-кратное снижение фосфорилирования Akt киназы по Ser473 и 3,3-кратное по Thr308, а также 1,5-кратное увеличение фосфорилирования p38 по по T180 и Y182.

Обсуждение. В данной работе была впервые использована технология CRISPR/Cas9 для направленного нокаута гена *PLAUR* в линейных клетках Neuro2a. Были получены клоны Neuro2a со стабильно сниженной экспрессией uPAR, на которых изучали эффекты снижения экспрессии uPAR на пролиферацию и внутриклеточную сигнализацию.

Оказалось, что Neuro2a имеет экспрессию TrkA, TrkB, TrkC, p75NTR, что характеризует её как агрессивную опухоль. Известно, что в нейробластоме взаимодействие TrkC с его лигандом NT-3 изменяет внутриклеточную сигнализацию с участием киназ PI3K/Akt, MAPK/Erk1/2 и p38MAPK и поддерживает высокую выживаемость клеток опухоли. Исследуя эти сигнальные пути, мы обнаружили, что снижение экспрессии *PLAUR* сопровождается снижением мРНК TrkC, подавляет пролиферацию Neuro2a и влияет на сигнализацию с участием киназ Akt и p38MAPK. Возможно, что в Neuro2a экспрессия uPAR на мембране стимулирует высокую пролиферативную активность этих клеток не только за счет uPA-опосредованного внеклеточного протеолиза и активации матриксных факторов роста, но и за счёт регуляции внутриклеточной сигнализации с участием рецепторов нейротрофинов и их сигнальных посредников — митоген-зависимых киназ.

Выводы. Использование CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии *PLAUR* позволяет не только изучать влияние uPAR на пролиферацию и инвазию нейробластомы, но выбрать эффективную терапевтическую стратегию. Полученные данные актуальны как для изучения фундаментальных вопросов современной биологии, так и для поиска новых потенциальных мишеней для лечения онкологических заболеваний.

Исследование выполнено за счёт средств гранта РНФ (№ 14-24-00086) и Гранта РФФИ (№ 17-04-00386).

Литература:

1. Fauvet J., Campagne J., Chavy A. et al. [Spontaneous cures, regressions and remissions of cancers]. Rev. Prat. 1960; 10: 2349–84. French.
2. Jessy T. Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer. J. Nat. Sci. Biol. Med. 2011; 2(1): 43–9.
3. Brodeur G.M., Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2014; 11(12): 704–13.
4. Tacconelli A., Farina A.R., Cappabianca L. et al. Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. Future Oncol. 2005; 1(5): 689–98.
5. Thiele C.J., Li Z., McKee A.E. On Trk-the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. Clin. Cancer Res. 2009; 15(19):5962–7.
6. Brodeur G.M., Minturn J.E., Ho R. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. Clin. Cancer Res. 2009; 15(10): 3244–50.
7. Li P., Gao Y., Ji Z. et al. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma. J. Pediatr. Surg. 2004; 39(10): 1512–9.
8. Gondi C.S., Lakka S.S., Dinh D.H. Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. Neuron Glia Biol. 2004; 1(2): 165–76.
9. Raghu H., Gondi C.S., Dinh D.H. et al. Specific knockdown of uPA/uPAR attenuates invasion in glioblastoma cells and xenografts by inhibition of cleavage and trafficking of Notch-1 receptor. Mol. Cancer 2011; 10:130.
10. Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Карагяур М.Н. и др. Использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии гена урокиназного рецептора в клетках нейробластомы. Техн. жив. сист. 2018; 15 (1), 10–19.
11. Rysenkova K.D., Semina E.V. Karagayur M.N. et al. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation. Oncotarget 2018; 9: 29414–30.

УД26

Ю.В. Сидорчук, А.С. Щелокова,
Н.В. Пермякова, Е.В. Дейнеко

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАТИВНОСТИ СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* С НОКАУТОМ ГЕНА *GAUT1*

Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Yu.V. Sidorchuk, A.S. Shchelokova, N.V. Permyakova,
E.V. Deineko

A STUDY OF CELL AGGREGATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SUSPENSION CULTURE WITH *GAUT1* GENE KNOCKOUT

The Federal Research Center Institute of Cytology
and Genetics of the Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

sidorch@bionet.nsc.ru

Введение. Растительные суспензионные системы экспрессии — перспективная альтернатива традиционным. Их самый существенный недостаток — низкий выход целевых продуктов по сравнению с культурами клеток млекопитающих. Предполагается, что одна из причин низкой продуктивности — тенденция растительных клеток к образованию агрегатов в суспензиях. Известно, что уменьшение размера клеточных агрегатов сопряжено с резким возрастанием синтетических способностей растительной клетки в культуре *in vitro* [1], но до сих пор однозначно не установлена природа связи между клетками в агрегатах. В работах нескольких групп исследователей была показана роль пектина в межклеточной адгезии [2]. Основываясь на представленных в литературе данных, мы предложили совершенно новый способ снижения агрегативности суспензионных культур растительных клеток: сайт-направленное нокаутирование гена галактуронозилтрансферазы-1 — одного из основных ферментов биосинтеза пектина [3]. Ожидалось, что такая процедура приведет к уменьшению адгезионных свойств клеток, их способности образовывать крупные кластеры и, следовательно, к повышению выхода рекомбинантного белка.

Материал и методы. В работе использовали быстрорастущую суспензионную культуру клеток *A. thaliana* (предоставлена А.В. Носовым, ИФР РАН, г. Москва) и полученные на её основе суспензионные культуры трансгенных клеток, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*). Нокаутирование гена *GAUT1* проводили посредством системы CRISPR/Cas9 с использованием gRNA, нацеленной на участок первого экзона целевого гена. Для доставки генетических конструкций в клетки использовали биобаллистическую трансформацию. Наличие мутаций в целевом гене подтверждали рестрикционным анализом ПЦР фрагментов и секвенированием. Сравнительный анализ ростовых характеристик проводили по общепринятому протоколу. Динамику изменения агрегативности клеточных суспензий исследовали с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Количественный анализ накопления тестового рекомбинантного белка GFP проводили флуориметрическим методом.

Результаты исследования. По результатам рестрикционного анализа две линии, полученные на основе

трансгенной клеточной культуры *A. thaliana*, показали наличие нарушений в сайте узнавания рестриктазы *HindIII*. Секвенирование выявило наличие однонуклеотидных замен и делеций в целевом районе редактируемого гена. Обе клеточные линии, содержащие клетки с нокаутами гена *GAUT1*, были получены методом биобаллистической трансформации.

Нокаутирование гена *GAUT1* привело к значительному увеличению доли мелких агрегатов на фоне снижения доли крупных агрегатов, причем, в отличие от исходной культуры и трансгенных клеточных культур до редактирования, это снижение наблюдалось вплоть до окончания ростового цикла. Однако нокаутирование гена *GAUT1* не повлияло на скорость прироста биомассы в суспензионной культуре полученных линий и не привело к каким-либо изменениям в накоплении рекомбинантного белка.

Обсуждение. В геноме *A. thaliana* выделяют суперсемейство *GAUT1*-связанных генов [3]. До сих пор было изучено влияние на фенотип растений сайленсинга только 3-х генов из 10 в пределах данного суперсемейства: *GAUT12* [4], *GAUT13* и *GAUT14* [5]. Для исследования функций этих генов использовались методы РНК-интерференции, и Т-ДНК-индуцированного инсерционного мутагенеза. Нами впервые получен нокаут гена *GAUT1* в культуре клеток *A. thaliana* методом геномного редактирования. Было установлено, что нокаутирование гена *GAUT1* не угнетает рост клеток в суспензионной культуре. Вопреки ожиданиям, не удалось зафиксировать достоверное увеличение содержания GFP-белка в клетках нокаутных линий по сравнению с клетками исходной трансгенной линии. Однако это не означает, что выбранный подход к увеличению выхода рекомбинантного белка является неудачным. Можно предположить, что более активному синтезу рекомбинантного белка препятствуют не физические свойства культуры, а случайная интеграция гена *gfp*, например, в транскрипционно неактивный район генома *A. thaliana*.

Выводы. Нокаут гена *GAUT1* ведет к изменению качественного состава агрегатов в суспензионной культуре *A. thaliana*, но не влияет на наработку рекомбинантного белка GFP.

Работа была поддержана проектом РФФИ: 17-14-01099.

Литература:

1. Kolewe M.E., Henson M.A., Roberts S.C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. *Biotechnol. Prog.* 2011; 27(5): 1365–72.
2. Iwai H., Masaoka N., Ishii T. et al. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *PNAS USA* 2002; 99 (25): 16319–24.
3. Sterling J.D., Atmodjo M.A., Inwood S.E. et al. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *PNAS USA* 2006; 103 (13): 5236–41.
4. Biswal A.K., Hao Z., Pattathil S. et al. Downregulation of *GAUT12* in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnol. Biofuels* 2015; 8: 41.
5. Wang L., Wang W., Wang Y.Q. et al. *Arabidopsis* galacturonosyltransferase (*GAUT*) 13 and *GAUT14* have redundant functions in pollen tube growth. *Mol. Plant* 2013; 6 (4): 1131–48.

УД27

А.В. Смирнов, А.М. Юнусова, Н.Р. Баттулин
**УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ CRISPR/
 CAS9 ОПОСРЕДОВАННОГО ТРАНСГЕНЕЗА
 С ПОМОЩЬЮ СВЕРХЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ,
 УЧАСТВУЮЩИХ В РЕПАРАЦИИ ДНК**

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
 Институт цитологии и генетики Сибирского
 отделения Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ
 СО РАН), Новосибирск, Россия

A.V. Smirnov, A.M. Yunusova, N.R. Battulin
**ENHANCING CRISPR/CAS9-MEDIATED
 HOMOLOGY-DIRECTED REPAIR
 BY EXPRESSING DNA REPAIR PROTEINS**

*The Institute of Cytology and Genetics of the Siberian
 Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG
 SB RAS), Novosibirsk, Russia*

battulin@gmail.com

Introduction. CRISPR/Cas9 emerged as a highly efficient tool for genome modifications, especially helpful for designing complex chromosome rearrangements or site-specific transgene targeting. Unfortunately, while CRISPR/Cas9 shows terrific efficiency for homology-directed repair (HDR) for most cell types (usually tenths of percent of correctly modified clones), in some cases, like pronuclear microinjection or modifications of human IPS cells, genome-targeting efficiency is still below convenience. Hence, stimulation of homologous recombination (HR) is a hot topic. This goal is usually achieved either by inhibiting non-homologous end-joining pathway (NHEJ) or by stimulating HDR with various techniques: overexpression of DNA repair proteins, RNA interference or small molecules. Although these methods draw attention, their safety is under question due to disequilibrium of cellular DNA repair machinery that may cause global genomic instability. We decided to explore a more cautious approach where DNA repair proteins (or their fragments) are attached to Cas9 nuclease through peptide linker. This can help to locally trigger HDR-promoting histone marks in case of catalytically active proteins or simply bring more DNA repair factors by mere scaffold function known for most of these proteins. We chose three candidates (HR factors) for our pivotal experiments: CtIP, RNF169 and Kat5. CtIP is one of the core factors for resection. RNF169 is a recently identified RING E3 ubiquitin-ligase restricting NHEJ. KAT5 (TIP60) is a histone acetyltransferase that prevents 53BP1 from binding chromatin and inhibits NHEJ. Selected human proteins were attached to the C-terminus of Cas9 via a long peptide linker (60 aa).

Materials and Methods. We used a 'traffic light reporter' (TLR) assay for the two main DNA double-strand break (DSB) repair pathway, HDR and NHEJ [1]. Briefly, the reporter includes a nonfunctional yellow fluorescent gene (Venus), disrupted by the guide sequence for Cas9 cleavage, followed by a red fluorescent gene (TagRFP) in a reading frame shifted by 2 bp. In the presence of intact Venus donor template, cells that repair DSB by HDR express Venus, while RFP-positive cells represent NHEJ-repair events (1/3 of all events). Thus, HR/NHEJ efficiency can be evaluated based on Venus/RFP fluorescence ratio in sorted cell population. TLR cassette was precisely integrated into the AAVS1 locus of HEK293 cells by CRISPR/Cas9 system.

Results. In a typical transfection experiment, TLR assay shows 2–3% HDR (Venus+) and 1–1.5% NHEJ (RFP+),

and cells transfected without gRNA showed 1% HDR and 0% NHEJ. This HDR "noise" is due to a random integration of transfected Venus donor vector.

We have prepared a set of plasmids that express Cas9 merged with HR factors or expressed HR factors from separate plasmids, and evaluated their efficiency with TLR reporter. Obtained results showed that our domains do not stimulate HR, neither when merged with Cas9 or expressed separately, with exception of CtIP and RNF169 overexpression, which showed reproducible increase of HDR. The ratio of HDR related to overall DNA repair events (assigned as factor R) was 40% and 60% respectively versus 30% in control experiment. Of note, addition of such large protein adducts (20–50% size of Cas9 nuclease) did not hinder Cas9 cleavage activity.

Additionally, we have studied how valproic acid (VPA) influences the balance of DNA repair. We assumed that VPA, a well-known inhibitor of histone deacetylases that alters chromatin structure, could stimulate HDR through hyperacetylation of the chromatin and opening target site for repair. Immediately after plasmids transfection, we treated TLR-reporter cells with VPA (1mM or 5mM) for 24h. 72h after the samples were analyzed for Venus and RFP fluorescence on FACS. We observed only slight improvements in the rate of HDR events for 5 mM VPA: factor R increased to 5–10% for all experimental conditions with the exception of Cas9 merged with HR factors.

Discussion. We have tested how different approaches can improve HDR efficiency with CRISPR/Cas9. Integrated fluorescence reporters like the traffic light reporter provide researchers with convenient tool to screen for multiple factors potentially beneficial for CRISPR/Cas9 field. For instance, similar approach had recently helped to discover that Rad52 at the N-terminus of Cas9 could increase HDR efficiency two-fold [2]. We did not manage to achieve HDR stimulation with our protein adducts, however we showed that RNF169 overexpression could stimulate HDR and inhibit NHEJ, which was also recently demonstrated with another system. Thus, this approach is viable and requires a search for new factors.

We will also proceed testing VPA influence on HDR with TLR reporter. Plenty of studies demonstrate the differences in rates of HDR efficiency between transcriptionally active (open chromatin) and inactive genes (closed chromatin). Noteworthy, a recent article by Takayama et al. [3] reports the highly efficient biallelic genome editing of human IPS/ES cells with VPA. Because this small molecule is simple, cost-effective and can be broadly applicable in various settings, it is worth testing at different cell types and treatment conditions.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 16-14-00095).

References:

1. Chu V.T., Weber T., Wefers B. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33(5): 543–8.
2. Shao S., Ren C., Liu Z. et al. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2017; 92: 43–52.
3. Takayama K., Igai K., Hagihara Y. et al. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(9): 5198–207.

УД28

Г.А. Степанов^{1*}, М.В. Сергеева^{1,2},
С.П. Медведев^{1,3}, А.А. Малахова^{1,3},
Е.Д. Андреева², А.-П.С. Шурыгина², А.Н. Горшков²,
М.М. Тимофеева¹, Е.А. Балахонova¹,
М.П. Грудинин², В.А. Рихтер¹, А.Б. Комиссаров^{1,2*}

**ГЕНОМНЫЙ НОКАУТ ФАКТОРОВ
ПРОТИВОВИРУСНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ
ПРОДУКЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА**

¹ Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт гриппа
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
Новосибирск, Россия

G.A. Stepanov^{1*}, M.V. Sergeeva^{1,2}, S.P. Medvedev^{1,3},
A.A. Malakhova^{1,3}, E.D. Andreeva², A.-
P.S. Shurygina², A.N. Gorshkov², M.M. Timofeeva¹,
E.A. Balakhonova¹, M.P. Grudin², V.A. Richter¹,
A.B. Komissarov^{1,2*}

**GENOMIC KNOCKOUT OF ANTIVIRAL
RESISTANCE FACTORS IS THE WAY TO CREATE
CELL LINES FOR THE PRODUCTION OF THE
INFLUENZA VIRUS STRAINS**

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare
of Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

³ Federal Research Centre "Institute of Cytology and
Genetics SB RAS", Novosibirsk, Russia

*stepanovga@niboch.nsc.ru,

**andrey.komissarov@influenza.spb.ru

Введение. Грипп представляет собой растущую угрозу для здоровья населения во многих странах с ежегодными эпидемиями в зимний период, сопровождающимися значительным подъемом заболеваемости и смертности. Ежегодно в эпидемический сезон в России заболевает до 10% населения, а от гриппа и его осложнений умирает несколько тысяч человек. Вакцинопрофилактика является наиболее рациональной стратегией борьбы с гриппозной инфекцией. Современный метод производства противогриппозных вакцин, основанный на накоплении вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах, очень трудоемок и длителен. Кроме того, культивирование вируса на куриных эмбрионах способствует накоплению адаптивных мутаций, что изменяет антигенные свойства вакцинных штаммов. Таким образом, в настоящее время существует очевидная потребность в разработке более быстрых и технологически более совершенных подходов к производству вакцин. В то же время технология производства противогриппозных вакцин с использованием человеческих клеточных культур является более гибкой и быстрой, а также лишенной всех перечисленных недостатков. Использование клеточных культур человеческого происхождения для накопления вирусов гриппа осложняется недостаточной изученностью механизмов перmissивности клеток к гриппозной инфекции.

Целью данной работы является исследование геномного нокаута одного из факторов устойчивости клеток человека к вирусу гриппа А гена *AlxA6* для обеспечения повышенной репликации вируса гриппа с максимальным сохранением антигенных свойств.

Материал и методы. Нокаут гена-мишени *AlxA6* проводили с помощью внесения точечных разрывов в гене с помощью системы CRISPR/Cas9, закодированной в вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). Конструирование специфичных протоспейсеров осуществляли с помощью CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu/>). Характер мутаций в гене-мишени был проанализирован методом Сэнгера и отобраны клоны, содержащие мутации, обеспечивающие сдвиг рамки считывания. Анализ скорости роста клеток проводили с использованием системы многопараметрического анализа клеточных культур RTCA xCelligence (ACEA Biosciences). Анализ уровня экспрессии гена *AlxA6* в полученных модифицированных линиях проводили методами вестерн-блота и точечной цитофлуориметрии с флуоресцентно мечеными антителами. Накопление вируса исследовали методами ОТ-ПЦР в режиме реального времени по накоплению вирусной РНК в среде, титрованием на клеточной культуре MDCK, а также методом иммунофлуоресценции с помощью окрашивания антителами против вирусного белка NP. Анализ вирионов проводили с помощью электронной микроскопии.

Результаты исследования и обсуждение. С помощью CRISPR/Cas9 были получены жизнеспособные, активно делящиеся *AlxA6*^{-/-} клоны. Геномный нокаут гена *AlxA6* обеспечивал повышенный уровень продукции вируса гриппа в клетках человека 293FT.

Выводы. Таким образом, были получены первые результаты стратегии рационального выбора генов для селективного нокаута с целью повышения чувствительности и продуктивности клеточных линий по отношению к вирусу гриппа. Нокаут гена-мишени *AlxA6* может рассматриваться в качестве одного из этапов создания перmissивной культуры для наработки штаммов вируса гриппа.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10069).

УД29

Е.И. Устьянцева¹⁻⁴, Л.М. Кулишова^{2, 4},
С.П. Медведев¹⁻⁴, Д.О. Жарков^{2, 4}, С.М. Закиан¹⁻⁴

ДОСТАВКА КОМПОНЕНТОВ CRISPR/CAS9 В ВИДЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ: НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет Новосибирск, Россия

E.I. Ustyantseva¹⁻⁴, L.M. Kulishova^{2, 4},
S.P. Medvedev¹⁻⁴, D.O. Zharkov^{2, 4}, S.M. Zakian¹⁻⁴

CRISPR/CAS9 DELIVERY IN FORM OF RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES: A NOVEL APPROACH TO INCREASE EDITING EFFICIENCY

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ E. Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

eremeeva1993@gmail.com

Введение. С момента открытия CRISPR/Cas9 широко внедрился в лаборатории по всему миру и стал рутинным методом для манипуляций с геномом на различных уровнях. Наиболее широкое распространение CRISPR/Cas9 получил в сфере биомедицинских исследований как потенциальный инструмент для генной и клеточной терапии. Основным модельным объектом таких исследований в настоящий момент являются культуры клеток: первичные, иммортализованные или плюрипотентные стволовые. Тем не менее, несмотря на безусловный прогресс в области редактирования генома культивируемых клеток, остается ряд ограничений, не позволяющих использовать CRISPR/Cas9 полноценно. К этим ограничениям относятся, в частности, низкая эффективность доставки компонентов CRISPR/Cas9 в определенные типы клеток, такие как плюрипотентные стволовые клетки, и следующая из нее крайне низкая эффективность редактирования посредством гомологичной рекомбинации [1]. Традиционный метод доставки CRISPR/Cas9 с помощью плазмиды, кодирующей два основных компонента системы: белок Cas9 и направляющая РНК, — относительно прост и не требует вовлечения большого количества ресурсов. Однако эффективность трансфекции плазмидами подобного размера (более 8,5 п.н.) относительно низкая [2]. Адаптация протоколов для получения и очистки белка Cas9 и синтеза направляющих РНК привела к возникновению нового веяния в редактировании генов — доставки в клетки комплексов белка Cas9 и направляющих РНК, сформированных в пробирке (RNP).

Материал и методы. Белок Cas9 с сигналом ядерной локализации был наработан путем ферментации в *E. coli* и очищен путем двухступенчатой хроматографии на различных субстратах: Ni-NTA и гепарин. Доставка RNP проводилась на приборе Neon Transfection System. Подсчет эффективности редактирования осуществлялся по % инделов, возникших спустя 48 часов после электропорации при помощи ресурса <https://tide.deskgen.com>.

Результаты исследования. В ходе работы был получен и очищен белок Cas9. Данный белок продемонстрировал наличие нуклеазной активности в присутствии направляющей РНК *in vitro* и отсутствие неспецифической нуклеазной активности. В системе HEK293 было показано, что использование RNP позволяет достичь эффективности редактирования до 89 %, что в 5 раз выше, чем при использовании плазмиды. Эффективность редактирования в системе плюрипотентных стволовых клеток достигла 45 %.

Обсуждение. Полученный белок Cas9 обладает целевой нуклеазной активностью, которую демонстрирует в присутствии направляющей РНК, как в условиях химической реакции в растворе, так и в клетке. Использование RNP для редактирования генома культивируемых клеток позволяет добиться получения большого количества клеток с отредактированным геномом за счет более эффективного проникновения RNP внутрь клетки, а также немедленного начала работы CRISPR/Cas9 сразу после трансфекции. Немаловажным является высокая эффективность редактирования в системе стволовых клеток, типично тяжело подвергающихся трансфекции, поскольку именно стволовые клетки в настоящий момент являются потенциальным источником материала для клеточной и генной терапии.

Выводы. Получен белок Cas9, который обладает целевой нуклеазной активностью. Данный белок в комплексе с направляющей РНК, будучи трансфицированным к культивируемым клеткам, обладает способностью вызывать двунитевые разрывы в целевых генах, что необходимо для их редактирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00440.

Литература:

4. Liang X., Potter J., Kumar S. et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* 2015; 208: 44–53.
5. Lesueur L.L., Mir L.M., André F.M. Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells *in vitro*. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2016; 5: e291.

УДЗО

Ю.А. Филиппова¹, А.М. Матвеева^{1,2},
Е.С. Журавлев¹, М.М. Тимофеева¹,
Е.А. Балахонova¹, В.А. Рихтер¹,
Д.В. Семенов¹, Г.А. Степанов^{1,2}

ГЕНОМНЫЙ НОКАУТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR/CAS9 СИСТЕМ КАК НОВЫЙ ПУТЬ К ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ КОРОТКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК: ПЕРСПЕКТИВЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

J.A. Filippova¹, A.M. Matveeva^{1,2}, E.S. Juravlev¹,
M.M. Timofeeva¹, E.A. Balakhonova¹, V.A. Richter¹,
D.V. Semenov¹, G.A. Stepanov^{1,2}

CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME KNOCKOUT AS A PROMISING APPROACH TO FUNCTIONAL ANALYSIS OF SHORT REGULATORY RNA: A CASE STUDY OF SMALL NUCLEOLAR RNA

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

stepanovga@niboch.nsc.ru

Введение. Короткие регуляторные РНК выполняют важную функцию в клетках, осуществляя тонкую регуляцию экспрессии генов. Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) представляют собой класс регуляторных РНК, которые, зачастую, закодированы в интронах генов, кодирующих компоненты систем синтеза рибосом и трансляции. Основной функцией мяоРНК является участие в пост-транскрипционном созревании рРНК в клетках эукариот. Семейство C/D-бокс-мяоРНК осуществляет метилирование нуклеотидов рРНК по 2'-О-положению рибозы. Ключевыми элементами C/D-бокс-РНК являются консервативные последовательности боксы С и D и область узнавания рРНК-мишени [1].

Одним из подходов к изучению функций мяоРНК является изменение последовательности ключевых элементов их структуры. С развитием методов геномного редактирования появилась возможность осуществлять нокаут различных генов [2]. Большинство работ по тематике геномного редактирования направлено на нокаут белок-кодирующих генов, что приводит к подавлению уровня белкового продукта гена-мишени. Редактирование последовательностей мяоРНК, закодированных в интронах других генов, позволит получить клеточные линии, нокаутные по данным РНК с сохранением экзонной структуры гена-хозяина, и провести селективный анализ свойств таких мяоРНК. Данная работа посвящена изучению свойств мяоРНК путем изменения их первичной структуры с использованием методов геномного редактирования.

Материал и методы. В качестве модельного гена для исследования свойств мяоРНК был выбран ген *gas5*, основным продуктом которого является длинная некодирующая РНК GAS5. В интронах *gas5* закодировано 10 мяоРНК. В качестве клеточной культуры для изучения свойств мяоРНК использовали эмбриональные клетки почек человека 293FT (Thermo Fisher Scientific). Для получения CRISPR/Cas9 конструкций,

направляющих редактирование генов мяоРНК, использовали вектор PX458 (pSpCas9(BB)-2A-GFP, #48138). Последовательности sgRNA были выбраны таким образом, чтобы направлять мутации в различные функциональные участки мяоРНК-мишени. Проводили трансформацию клеток 293FT полученными векторными конструкциями, отбор отдельных клонов с последующим анализом изменений в уровне экспрессии целевой мяоРНК и глубине 2'-О-метиличивания нуклеотида-мишени. Для оценки функциональности мутантных форм мяоРНК и изменений в профиле 2'-О-метиличивания рРНК-мишени применяли подходы, основанные на терминеции обратной транскрипции, которые были разработаны нами ранее [3].

Результаты исследования. Были получены клоны 293FT, содержащие различные мутации в генах целевых мяоРНК. Секвенирование выявило как точечные мутации в целевых участках *gas5*, так и протяженные инсерции/делеции. Анализ уровня экспрессии целевых мяоРНК выявил снижение общего уровня таких РНК. При этом, уровень экспрессии мяоРНК, закодированной в вышележащем интроне, остался прежним. Анализ глубины 2'-О-метиличивания рРНК в полученных клонах методом терминеции обратной транскрипции показал снижение в уровне (вплоть до полного отсутствия) модификации нуклеотида-мишени.

Обсуждение. Получение клеточных линий, нокаутных по генам мяоРНК, представляет собой перспективную задачу, которая позволяет изучать клеточные процессы с участием мяоРНК. Во-первых, нокаут мяоРНК позволяет оценить влияние таких РНК на уровень экспрессии других мяоРНК из этого же гена, а также сплайсинг гена-хозяина. Во-вторых, анализ дифференциальной экспрессии мутантных клеток дает возможность поиска неканонических функций мяоРНК. В-третьих, данный подход создает перспективу создания и оценки действия искусственных систем направленного 2'-О-метиличивания в клетках человека.

Выводы. Показано, что точечные мутации, опосредованные CRISPR/Cas9, позволяют осуществлять подавление активности таргетных C/D-бокс-РНК. Клеточные линии с нокаутом отдельных мяоРНК могут быть использованы для установления их роли в развитии патологических процессов, ассоциированных с заболеваниями человека и животных [4].

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-29-07073)

Литература:

1. Jorjani H., Kehr S., Jedlinski D.J. et al. An updated human snoRNAome. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(11): 5068–82.
2. Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum. Mol. Genet.* 2014; 15(23): R40–6.
3. Филиппова Ю.А., Степанов Г.А., Семенов Д.В. и др. Модифицированный метод анализа структуры рРНК позволил выявить новые свойства аналогов C/D-бокс-РНК. *Acta Naturae* 2015; 7(2): 69–78.
4. Stepanov G.A., Filippova J.A., Kuligina E.V. et al. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases. *BioMed Research International* 2015; 2015: 206849.

УД31

А.И. Шевченко¹⁻⁴, И.С. Захарова¹⁻³,
Н.А. Рифель⁴, Е.В. Григорьева¹⁻⁴,
С.П. Медведев¹⁻⁴, С.М. Закиан¹⁻⁴

РЕПРЕССИЯ И АКТИВАЦИЯ ГЕНА *XIST* ПОСРЕДСТВОМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский
центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Минздрава РФ, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

A.I. Shevchenko¹⁻⁴, I.S. Zakharova¹⁻³, N.A. Rifel⁴,
E.V. Grigor'eva¹⁻⁴, S.P. Medvedev¹⁻⁴, S.M. Zakian¹⁻⁴

CRISPR/CAS9 MEDIATED DOWNREGULATION AND ACTIVATION OF *XIST* GENE

¹ Institute of Cytology and Genetics of SB RAS,
Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine of the SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Centre,
Ministry of Health Care of Russian Federation,
Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

epigene@bionet.nsc.ru

Введение. У самок млекопитающих протяженная некодирующая ядерная РНК гена *Xist* аккумулируется на одной из двух X-хромосом, запуская процесс инактивации, ранние этапы которого, протекающие на преимплантационных стадиях развития эмбриона, малоизучены и имеют значительные межвидовые отличия. В данном исследовании планировалось, используя трофобластные стволовые (ТС) клетки полёвки *M. levis*, моделирующие преимплантационное развитие, подтвердить функциональность предсказанного ранее у данного вида минимального промотора гена *Xist*, установить, как подавление транскрипционной активности гена *Xist* повлияет на инактивацию X-хромосомы, а также выяснить, какие элементы процесса инактивации будут воспроизводиться при активации эктопической экспрессии РНК *Xist*.

Материал и методы. В работе использовалась система CRISPR/Cas9 для подавления и инициации эктопической транскрипции гена *Xist* в линиях ТС-клеток полёвки *M. levis*.

Результаты исследования и обсуждение. В данной работе с помощью искусственных нуклеаз CRISPR/Cas9 в геноме ТС-клеток, содержащих активную и неактивную X-хромосомы, делетировали предсказанную область базального промотора гена *Xist*. Результаты анализа клонов ТС-клеток с делецией в 5' области *Xist* позволяют заключить, что у *M. levis* удаленная область действительно выполняет роль основного промотора *Xist* и отвечает за формирование функциональной РНК гена *Xist*, способной распространяться по X-хромосоме. Минорная транскрипция, выявляющаяся после делеции основного промотора активного гена, может свидетельствовать о наличии у *M. levis* дополнительных минорных промоторов *Xist*, или же является результатом низкоуровневой транскрипции гена с неактивного метилированного аллеля *Xist*.

Исследование ТС-клеток с подавленной экспрессией гена *Xist* показало, что *Xist* РНК не вносит существенного вклада в поддержание неактивного состояния X-хромосомы. Подавление экспрессии *Xist* не обнаружило влияния на транскрипционный сайленсинг генов неактивной X-хромосомы. Кроме того, РНК гена *Xist* не являлась необходимой для поддержания на неактивной X-хромосоме при импринтированной инактивации в ТС-клетках *M. levis* модификаций гистонов H3K9me3 и H4K20me3, а также белков HP1, KAP1 и SETDB1. Тем не менее, в дальнейшем в дифференцированных трофобластных клетках транскрипт гена *Xist* был необходим для привлечения на неактивную X-хромосому дополнительной репрессирующей хроматин модификации — триметилированного H3K27.

Кроме того, мы запускали эктопическую экспрессию гена *Xist* на единственной активной X-хромосоме в трофобластных стволовых клетках с кариотипом 53, XO, применяя систему SAM-активации, в которой дефектная нуклеаза Cas9 способна привлекать сильные конститутивные активаторы транскрипции к сайту в геноме, где происходит связывание направляющей РНК. Было показано, что при использовании данного подхода активация транскрипции *Xist*, детектируемая с помощью РНК-FISH, происходила приблизительно в 3% клеток. РНК *Xist* аккумулировалась в ядре и оставалась связанной с X-хромосомой. Таким образом, можно заключить, что в ядрах ТС-клеток присутствуют факторы, позволяющие РНК гена *Xist* распространяться по X-хромосоме и закрепляться на ней. Незначительная доля клеток, в которых произошла активация *Xist*, не позволила нам выяснить, как повлиял запуск его экспрессии на активность генов X-хромосомы и состав хроматина. Это планируется установить в дальнейшем, после получения клонов ТС-клеток с эктопической экспрессией *Xist* на единственной X-хромосоме.

Выводы. Методы репрессии и активации транскрипции на основе системы искусственных нуклеаз CRISPR/Cas9 эффективны для исследования функций протяженных некодирующих ядерных РНК и после оптимизации могут рассматриваться как средство направленной регуляции экспрессии гена *XIST* при лечении заболеваний у человека.

Работа выполнялась в рамках государственного задания «Молекулярно-генетические основы регуляции экспрессии генов, морфологии, дифференцировки и перепрограммирования клеток» № 0324-2018-0019.

УД32

М.В. Шепелев*, А.В. Дейкин, С.В. Калиниченко,
Е.К. Саакян, В.А. Калмыков, И.В. Коробко

**ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ
С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ЗАМЕЩЕНИЕМ
ГЕНА АНТИТРОМБИНА III
НА ГОМОЛОГИЧНЫЙ ГЕН ЧЕЛОВЕКА,
ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ
CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ**

*Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук, Москва, Россия*

M.V. Shepelev*, A.V. Deykin, S.V. Kalinichenko,
E.K. Saakian, V.A. Kalmykov, I.V. Korobko

**GENERATION OF TRANSGENIC MICE
WITH THE FUNCTIONAL REPLACEMENT
OF ANTITHROMBIN III GENE WITH THE HUMAN
HOMOLOG BY CRISPR/CAS9-MEDIATED
HOMOLOGOUS RECOMBINATION**

*Institute of gene biology Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia*

*mshepelev@mail.ru

Введение. Использование трансгенных животных в качестве биореакторов для синтеза рекомбинантных белков с их секрецией в молоко является актуальным трендом и позволяет нарабатывать рекомбинантные белки в существенно больших количествах и со значительно меньшими затратами по сравнению с культурами клеток эукариот [1]. В настоящий момент коммерчески доступны лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков человека, получаемых из молока животных-продуцентов. В частности, рекомбинантный антитромбин III (АТЗ) человека, получаемый из молока трансгенных коз (лекарственный препарат Atryn®). Однако молоко трансгенных животных, помимо рекомбинантных белков крови человека, содержит примеси гомологичных белков животного-продуцента, очистка от которых либо сильно затруднена, либо невозможна в силу схожести их физических свойств. Присутствие примесных белков в лекарственных препаратах может привести к развитию иммунного ответа на такой белок, что в силу высокой гомологии, может вызывать иммунный ответ на рекомбинантный белок лекарственного препарата. Тем не менее, возможно получить рекомбинантные белки из молока без примесей гомологичных белков животного-продуцента путем инактивации эндогенного гена животного с одновременным функциональным замещением его геном человека.

Цель работы — инактивация гена антитромбина III (АТЗ) мыши и функциональное замещение его геном АТЗ человека с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации.

Материал и методы. Генетические конструкции для трансгенеза создавали с помощью стандартных методов геномной инженерии. Дизайн и выбор sgPНК проводили с помощью ресурса <http://crispr.mit.edu/>, соответствующие комплементарные олигонуклеотиды клонировали в вектор pX330 (Addgene #42230). Для проверки модификации генома мыши с помощью системы CRISPR/Cas9 в эмбрионы мыши микроинъектировали плазмиды для экспрессии sgPНК и нуклеазы Cas9 или мPНК Cas9 и синтезированные in vitro sgPНК. Эмбрионы

инкубировали до стадии бластоцисты и анализировали расщепление геномной ДНК целевого локуса с помощью анализа с эндонуклеазой T7 [2]. Для получения трансгенных животных в мужской pronucleus зигот микроинъектировали смесь генетической конструкции для трансгенеза (кольцевая плаزمид) с мPНК никазы Cas9 и двумя синтезированными in vitro sgPНК. Трансгенных животных идентифицировали с помощью ПЦР.

Результаты исследования. Для функционального замещения гена АТЗ мыши его человеческим гомологом была выбрана стратегия, заключающаяся в CRISPR/Cas9-опосредованной интеграции генетических конструкций в locus АТЗ мыши с сохранением эндогенных 5'-регуляторных последовательностей гена АТЗ мыши, таким образом, чтобы кодон инициации трансляции эндогенного белка становился кодоном инициации трансляции белка АТЗ человека. Были созданы генетические конструкции для трансгенеза, включающие плечи гомологии длиной около 2 т.п.н., фланкирующие экспрессионную кассету АТЗ человека, несущую кДНК или миниген. Миниген АТЗ конструировали путем удаления протяженных интронных областей с сохранением фланкирующих интронных последовательностей для обеспечения корректного паттерна сплайсинга минигена. Помимо этого, в 3'-области конструкций после кодирующих последовательностей и сигнала полиаденилирования помещали двунаправленный терминатор транскрипции для предотвращения возможной транскрипции эндогенного гена АТЗ мыши, в том числе за счет транскрипции трансгена.

Трансгенных животных получали путем микроинъекций смеси двух sgPНК, мPНК никазы Cas9 и генетической конструкции для трансгенеза в виде кольцевой плазмидной ДНК. В результате с помощью ПЦР были идентифицированы первичные трансгенные животные, несущие кДНК или миниген АТЗ. В результате скрещивания были получены животные поколений F1 и F2, в том числе гомозиготные по трансгену, что свидетельствует о функциональном замещении гена АТЗ мыши минигеном и кДНК АТЗ человека. Корректная интеграция трансгена в locus АТЗ мыши была подтверждена с помощью ПЦР.

Обсуждение и выводы. На примере гена АТЗ была разработана и успешно апробирована стратегия получения трансгенных животных-продуцентов рекомбинантных белков в молоко, не содержащее примесей эндогенного белка животного. С помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации были получены трансгенные мыши с сайт-специфической интеграцией в locus АТЗ мыши генетических конструкций для продукции белка АТЗ человека, с одновременной инактивацией эндогенного гена АТЗ мыши. Полученные результаты демонстрируют валидность разработанного нами подхода и открывают перспективы для получения животных-продуцентов значимых с точки зрения биотехнологии и медицины рекомбинантных белков, не содержащих примесей эндогенных белков животного-продуцента.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00150).

Литература:

1. Wang Y., Zhao S., Bai L. et al. Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. Biomed. Res. Int. 2013; Article ID 580463.
2. Sakurai T., Watanabe S., Kamiyoshi A. et al. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. BMC Biotechnol. 2014; 14: 69. Литература:

УД33

М.В. Шепелев, С.В. Калиниченко,
Е.К. Саакян, А.В. Дейкин, И.В. Коробко

**СОЗДАНИЕ БАЗОВЫХ ЛИНИЙ
ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ
CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ДЛЯ
ПОСЛЕДУЮЩЕГО ЭФФЕКТИВНОГО
ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО ТРАНСГЕНЕЗА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ RMCE
(RECOMBINASE MEDIATED CASSETTE
EXCHANGE)**

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук, Москва, Россия

M.V. Shepelev, S.V. Kalinichenko, E.K. Saakian,
A.V. Deykin, I.V. Korobko

**GENERATION OF BASIC
LINES OF TRANSGENIC MICE
BY CRISPR/CAS9-MEDIATED HOMOLOGOUS
RECOMBINATION FOR CONSEQUENT
EFFECTIVE AND DETERMINED TRANSGENESIS
BY MEANS OF RMCE (RECOMBINASE
MEDIATED CASSETTE EXCHANGE)**

Institute of gene biology Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

mshepelev@mail.ru

Введение. Генетически измененные лабораторные животные, в частности трансгенные мыши, являются эффективным инструментом для исследования фундаментальных свойств генов, белков и иных молекул и позволяют создавать модели заболеваний человека. Это обеспечивает возможности для исследования патогенеза заболеваний, выявления и валидации новых терапевтических мишеней, для эффективного поиска и разработки лекарственных средств и проведения доклинических исследований.

Цель работы — создание базовых линий трансгенных мышей, позволяющих с использованием универсального подхода эффективно получать трансгенных животных с заданной тканевой специфичностью экспрессии трансгена. Значимость результатов работы определяется упрощением, стандартизацией и эффективностью получения трансгенных животных с необходимым паттерном экспрессии трансгена.

Материал и методы. Для создания генетических конструкций для трансгенеза использовали стандартные методы геномной инженерии. Дизайн и выбор sgPHK проводили с помощью ресурсов <http://crispr.mit.edu/> и <http://chopchop.cbu.uib.no>, соответствующие комплементарные олигонуклеотиды клонировали в вектор pX330 (Addgene #42230). Для проверки модификации генома мыши с помощью системы CRISPR/Cas9 в эмбрионы мыши микроинъектировали плазмиды для экспрессии sgPHK и нуклеазы Cas9 или mPHK Cas9 и синтезированные in vitro sgPHK. Эмбрионы инкубировали до стадии бластоцисты и анализировали расщепление геномной ДНК целевого локуса с помощью анализа с эндонуклеазой T7 [1].

Результаты исследования. Для обеспечения различных паттернов экспрессии целевого трансгена были созданы три генетические конструкции для CRISPR/Cas9-опосредованной интеграции в локус *ROSA26* [2], содержащие два ассиметричных сайта рекомбинации

(F и F3) рекомбиназы Fp, которые после RMCE-опосредованной интеграции трансгена должны обеспечивать конститутивную, тканеспецифическую и индуцибельную экспрессию трансгена, соответственно. Дизайн генетической конструкции для интеграции в локус *Hipp11* [3] соответствовал таковому для конструкции с тканеспецифической экспрессией. Все конструкции содержали маркерную экспрессионную кассету для продукции зеленого флуоресцентного белка (EGFP) под контролем промотора гена кератина-14 человека. Согласно разработанному дизайну, конститутивная экспрессия трансгена должна обеспечиваться промотором CAG (модифицированный промотор β-актина кур с энхансером ранних генов цитомегаловируса) после интеграции трансгена с помощью RMCE. Для тканеспецифической экспрессии трансгена необходимо включение соответствующего тканеспецифического промотора в кассету для RMCE. Наконец, возможность индуцибельной экспрессии трансгена была реализована за счет размещения сильного двунаправленного терминатора транскрипции, фланкированного сайтами рекомбинации LoxP для рекомбиназы Cre, непосредственно после промотора CAG. Таким образом, экспрессия трансгена с промотора CAG будет активироваться лишь при опосредованном Cre-рекомбиназой удалении терминатора транскрипции.

Для проведения CRISPR/Cas9-опосредованной интеграции генетических конструкций был проведен дизайн sgPHK, выбрано по три таргетных последовательности для каждого локуса и созданы плазмиды для экспрессии sgPHK. Анализ активности выбранных sgPHK в бластоцистах позволил выбрать оптимальные варианты sgPHK, которые были синтезированы in vitro для проведения микроинъекций в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток для получения трансгенных животных.

Обсуждение и выводы. Был разработан дизайн четырех базовых линий трансгенных мышей и определены геномные локусы для интеграции базовых трансгенов (*ROSA26* и *Hipp11*). В соответствии с этим, разработана схема молекулярного клонирования и созданы генетические конструкции для трансгенеза (три для интеграции в локус *ROSA26* и одна для интеграции в локус *Hipp11*). Выбраны sgPHK и проведен анализ эффективности редактирования генома в таргетных локусах при микроинъекции плазмид, экспрессирующих sgPHK. На основании полученных результатов выбраны оптимальные варианты sgPHK для CRISPR/Cas9-опосредованной интеграции целевых генетических конструкций в геном мыши в локусы *ROSA26* и *Hipp11*.

Полученные результаты закладывают основу для успешного создания линий трансгенных мышей, которые позволят упростить, стандартизировать и существенно увеличить эффективность получения трансгенных животных с различными паттернами экспрессии целевых трансгенов.

Литература:

1. Sakurai T., Watanabe S., Kamiyoshi A. et al. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol.* 2014; 14: 1472–6750.
2. Zambrowicz B.P., Imamoto A., Fiering S. et al. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 3789–94.
3. Tasic B., Hippenmeyer S., Wang C. et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108: 7902–7.

УД34

А.Д. Юрина¹, А.М. Батырева¹, М.А. Кузнецова¹,
М.В. Лебедева¹, Н.Е. Злобин¹, А.В. Бабаков¹,
В.В. Таранов¹, А.А. Тимошенко², Н.В. Давыдова³,
А.К. Гапоненко², О.Н. Зубко⁴, М.Н. Полякова⁴,
С.А. Патухов⁴, Н.В. Маджарова¹,
Л.Н. Коновалова¹, С.Р. Стрельникова¹,
Р.А. Комахин¹, К.С. Гаврилова⁵,
А.М. Каминская⁵, К.Г. Скрябин⁵

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 НА РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ РАСТЕНИЙ

¹ ФГБНУ ВНИИСБ, Москва, Россия

² ИБР РАН, Москва, Россия

³ ФГБНУ ФИЦ «НЕМЧИНОВКА», пос. Новоивановское, Россия

⁴ РГАУ — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

⁵ Институт Биотехнологии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

A.D. Yurina¹, A.M. Batyрева¹, M.A. Kusnetzova¹,
M.V. Lebedeva¹, N.E. Zlobin¹, A.V. Babakov¹,
V.V. Taranov¹, A.A. Timoshenko², N.V. Davydova³,
A.K. Gaponenko², O.N. Zubko⁴, M.N. Polyakova⁴,
S.A. Pastukhov⁴, N.V. Madzharova¹,
L.N. Konovalova¹, S.R. Strelnikova¹, R.A. Komakhin¹,
K.S. Gavrilova⁵, A.M. Kamionskaya⁵, K.G. Skryabin⁵

SPECIAL ASPECTS OF A CRISPR/CAS9 SYSTEM IN VARIOUS PLANTS

¹ ARIAB RAS, Moscow, Russia

² IDB RAS, Moscow, Russia

³ Moscow Research Institute of Agriculture «Nemchinovka», pos. Novoivanovsky, Russia

⁴ RSAU — MTAA, 127550, Moscow, Russia

⁵ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

v.taranov1@gmail.com

Введение. Специфика биологии различных видов растений приводит к необходимости множества подходов в рамках технологии CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. В отличие от трансгенеза, подразумевающего вставку чужеродного гена в геном растения, геномное редактирование требует присутствия чужеродного генетического материала только до момента внесения в геном необходимой модификации. После этого присутствие трансгенов становится нежелательным, поскольку может приводить к накоплению нецелевых модификаций генома, а также провоцировать обеспокоенность общества. Именно необходимость удаления из генома генетического инструментария CRISPR/Cas9 в значительной степени предопределяет стратегию применения этой технологии на различных видах растений. Кроме того, многие растения, в том числе большинство сельскохозяйственных видов, полиплоидны, что требует создания высокоэффективного генетического инструментария для редактирования всех аллелей целевого гена.

Материал и методы. В работе использовались несколько культур, требующих индивидуального подхода к условиям редактирования.

Так, для модельного объекта *Arabidopsis thaliana* был применен наиболее простой и быстрый метод — обработка цветков суспензией *Agrobacterium tumefaciens*, в результате которой гены Cas9 и sgRNA

встраиваются в геномную ДНК ооцитов. При этом, ген Cas9 находится под контролем промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии в яйцеклетках, зиготах и на ранних стадиях развития зародыша, благодаря чему снижается химерность создаваемых растений с отредактированным геномом.

Однако, такой способ подходит далеко не для всех растений, поэтому для получения растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), устойчивых к мучнистой росе (*Erysiphe graminis tritici*) посредством нокаута генов *Mlo*, было необходимо подобрать оптимальный метод трансформации незрелых зародышей и последующей регенерации. Параллельно разрабатывался инструментальный для редактирования и в настоящий момент проводится оценка эффективности генетических конструкций с использованием протопластов клеток мезофилла.

В случае вегетативно размножающихся культур, таких как картофель (*Solanum tuberosum*), нецелесообразно получать семенные поколения из-за потери сортовых качеств. Для решения этой проблемы можно использовать альтернативный подход — трансфекцию протопластов плазмидной ДНК и редактирование генов-мишеней в результате транзиторной экспрессии. Последующая регенерация растений из соматической клетки позволяет получить нехимерное взрослое растение. В качестве мишени был выбран ген *GBSS*, кодирующий ключевой фермент, необходимый для синтеза амилозы в клубнях картофеля. Нокаут этого гена позволит получить растения картофеля, крахмал клубней которых практически не содержит амилозы.

Результаты исследования и обсуждение. С помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы линии *Arabidopsis thaliana* с выключенными генами белков с доменом холодового шока для изучения их роли в развитии и стрессоустойчивости растений. Отработанная методика применяется нами для редактирования другого растения из семейства *Brassicaceae*, белокочанной капусты (*Brassica oleracea*). В качестве мишеней для редактирования нами выбраны гены, вовлеченные в формирование восприимчивости этого растения к сосудистому бактериозу, вызываемому бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Направленное выключение этих генов позволит создать формы белокочанной капусты с повышенной устойчивостью к этому заболеванию.

Для получения растений пшеницы с нокаутом гена *Mlo*, устойчивых к мучнистой росе, на нескольких сортах мягкой пшеницы разработаны технологии трансформации путём бомбардировки незрелых зародышей золотыми частицами с нанесенной на них рекомбинантной ДНК, содержащей гены нуклеазы Cas9 и наводящей РНК sgRNA и последующей регенерации. В данных сортах были установлены нуклеотидные последовательности всех аллелей *Mlo*, а также подобраны sgRNA для первого или второго экзона аллелей гена *Mlo*. Созданы генетические конструкции для геномного редактирования *Mlo*, кодирующие разработанные sgRNA. Оптимизирован метод для оценки эффективности редактирования в протопластах пшеницы. Наиболее эффективная конструкция будет использована для трансформации незрелых зародышей с целью получения трансгенных растений пшеницы с нокаутом *Mlo*, для чего к настоящему моменту разработаны технологии трансформации и регенерации нескольких отечественных сортов мягкой пшеницы. В расщепляющемся потомстве этих растений будут отобраны нокаут-мутанты по гену *Mlo*, не содержащие вставок Т-ДНК.

Ведется работа по получению формы картофеля с нокаутом гена *GBSS*: созданы генетические конструкции

для редактирования и проведена оптимизация методики трансфекции протопластов.

Наиболее распространенным применением технологии CRISPR/Cas9 в контексте редактирования генома растений является создание нокаут-мутантов посредством внесения в кодирующую область целевого гена двуцепочечного разрыва, при репарации которого может происходить сбой рамки считывания и инактивация целевого гена. Однако, к настоящему моменту созданы варианты технологии CRISPR/Cas9, позволяющие направленно модифицировать отдельные нуклеотиды

в генах, приводя к изменению аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков. Такие варианты технологии CRISPR/Cas9 применяются нами для создания растений картофеля, устойчивых к заражению вирусом Y, путем направленного внесения точечных нуклеотидных замен в последовательность гена фактора инициации трансляции eIF4E, необходимого для размножения вируса Y в клетке.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-316-00134, № 17-29-08024.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

СД1

Н.В. Андреева¹, Н.Г. Гурская¹,
А.К. Бейлин², Е.А. Воротеляк^{1,2}

**СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ
БУЛЛЕЗНЫЙ ЭПИДЕРМОЛИЗ ПРОСТОГО
ТИПА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HACAT
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ
РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9**

¹ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия

N.V. Andreeva¹, N.G. Gurskaya¹, A.K. Beilin²,
E.A. Vorotelyak^{1,2}

**DEVELOPMENT OF A MODEL SYSTEM FOR
EPIDERMOLYSIS BULLOSA SIMPLEX IN HACAT
CELLS BY MUTAGENESIS OF KERATIN 5 USING
CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY**

¹ Pirogov Russian National Research Medical
University, Moscow, Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia

n_a2195@mail.ru

Introduction. Epidermolysis bullosa (EB) is a heterogeneous group of skin disorders caused by mutations in genes involved in skin structure stability maintains and inherited by autosomal-dominant or autosomal-recessive types. Clinical manifestations of EB depend on the causative genes and exact site of mutation. EB occurs with frequency 1:30000–1:1000000. There are about 500000 patients in the world. In the recent years about 20 genes had been identified and 1000 mutations in these genes cause EB [1]. In cases of EBS (which is the most common form of EB) 75 percent of cases are due to mutations in genes keratin 5 (*krt5*) and keratin 14 (*krt14*). Currently EB was considered to belong to the group of incurable inherited diseases and the respective therapy traditionally aimed at symptomatic treatment. Therefore, the perspective of cure is based now on gene therapy and the application of programmable nucleases (TALEN and CRISPR/Cas9 systems) for the repair of specific mutations can be considered promising [2].

Material and methods.

sgRNA and Cas9 plasmid construction and donor DNA. In our experiment two variants of Cas9 nuclease — spCas9 and nickase Cas9nD10A were used for precise genome editing. The strategy based on nickase usage requires the paired sgRNAs and donor DNA carrying fragment of exon 7 with specific EBS mutation K472-STOP.

Plasmids for experiment.

pSpCas9-IRES-EGFP (order in Evrogen)
pSpCas9n(BB)-2A-EGFP (Addgene #48140)
pU6-gRNA (kindly provided by B.V. Skryabin)
pAL2-T (Evrogen)

Cell culture and transfection. For delivery of plasmids in immortalized human keratinocytes HaCaT RT3 we applied electroporation and lipofection. **Electroporation**, or electroporabilization, is a technique in which an electrical field is applied to cells in order to increase the permeability of the cell membrane, allowing DNA to be introduced

into the cell. For our experiment we used the MicroPulser Electroporator (Bio-Rad). **Lipofection**, also known as “lipid transfection” or “liposome-based transfection,” uses a lipid complex to deliver DNA to cells. We used Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific).

Fluorescence-activated cell sorting. Selection was made through sorting EGFP⁺ cells because both plasmids with Cas9 were carrying EGFP gene. We used BioRadFluorescent Flow Cytometry.

Analysis of editing effectiveness. PCR amplification with specific to *krt5* oligonucleotides had been performed in order to reveal mutations (deletions or insertions) in clones (or mixture of clones) obtained. T7EI and digital PCR were applied to estimate the editing effectiveness. Sanger sequencing and NGS of the obtained specific PCR product were also used in order to estimate qualitatively the edited cells.

Results. In this work we focused on the development of a cellular model system with an impaired cytokeratin network, which mimics those found in the cases of epidermolysis bullosa simplex (EBS). We used CRISPR/Cas9 system to introduce indels in *krt5* gene of immortalized human cell HaCaT RT3. The on-target mutation frequency in HaCaT cells using Cas9 nuclease (spCas9) or Cas9 nickase (Cas9nD10A) genome editing had been analyzed and compared with paired sgRNAs, specific to exon 7 of *krt5* gene which include sequence encoding KLEGE motif. To perform genome editing of HaCaT transient transfection by the mixture of 2 plasmids was made. One plasmid encodes Cas9 with GFP, another — sgRNA. In the first experiment we used two plasmids with sgRNAs and Cas9 aiming to obtain a range of mutations with deletions and insertions in the gene. In the second cotransfection experiment we used Cas9 nickase with guide RNAs and donor DNA carrying fragment of exon 7 with specific EBS mutation K472-STOP and some SNPs for detection of target insertion event. Donor DNA sequence was inserted in PAL2T vector, the length of donor's DNA shoulders being 120 bp. After successful transfection the selection of EGFP⁺ cells was applied, as both plasmids with Cas9 carried the EGFP gene. Then the mixture of cells obtained was analyzed using PCR amplification of genomic DNA with specific to *krt5* fragment primers. The T7EI analysis was performed, using PCR-amplicons from different clones obtained after clonal selection. The aim of T7EI analysis was the estimation of the overall editing effectiveness. It was found that the editing happened indeed. We used digital droplet PCR to determine the level of homogeneity of DNA in populations of selected clones. To do this a pair of fluorescent probes were synthesized. Several clones were sequenced by Sanger protocol.

Then the amplicon targeted NGS was performed to evaluate the number of deletions, insertions and SNP occurred in the population of edited cells. The hot spots of mutagenesis in amplicon were found as the result. The percentage of mutant clones was 35% for Cas9 and 39% for Cas9nD10A editing experiments.

The sequence of one of the clones edited by Cas9 contained the deletion in the target site which caused the absence of KLEGE motif in *krt5* protein.

For visualization of keratin filament structure we made the transfections of edited clones with plasmid encoding KRT14-mCherry fusion. The keratins aggregates and thick nodes in mutant cells were found using the confocal microscopy.

Discussion. The model of EBS by mutagenesis in keratin 5 with CRISPR/Cas 9 technology was created in this project. The main aim of editing was exon 7 of *krt5* gene which included KLEGE motif. We choose this conserved motif because it was reported that mutation in this site impaired keratin 5 structure, disrupted the formation of heterodimer KRT5-KRT14 and induced aggregation in CKs network [3]. This region is a hotspot for EBS mutations (about 20 cases described). The loosening of this motif ends up with partly truncated protein possessing aggregating properties which obviously have impact on functions of the cells.

The genetic analysis had been performed in samples from patients with EBS in gene *KRT5*, which carry only one mutant allele (heterozygous mutation) [4]. SpCas9 and Cas9nD10A make the double-stranded breaks and both alleles of gene *krt5* could be mutant. Therefore the obtained model may be considered as a new approach to show that the homozygous genotype leads to structural changes in CKs network and there is possibility of clinical manifestations specific for EBS.

Also spCas9 and Cas9nD10A made double-stranded breaks by means of NHEJ mechanism. This fact explains the presence of variable mutations (insertions and deletions) in clones after CRISPR/Cas9 *krt5* editing of HACaT.

Conclusions. The study of particular clones with impaired *krt5* gene permitted us to observe structural abnormalities in IFs and the formation of IF aggregates in keratinocytes. The model constructed with CRISPR/Cas9 technology might be useful in investigations of the role of mutations in manifestation of phenotypic properties specific for EBS and in creating possible new pathways for these phenotypes corrections.

This work was funded by the Presidium of RAS Program "Fundamental Research for Biomedical Technologies" № O108-2018-0009.

References:

1. Sawamura D., Nakano H., Matsuzaki Y. Overview of epidermolysis bullosa. *J. Dermatol.* 2010; 37(3): 214–9.
2. Peking P., Koller U., Muraier E.M. Functional therapies for cutaneous wound repair in epidermolysis bullosa. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018; 129: 330–43.
3. Müller F.B., Anton-Lamprecht I., Küster W., Korge B.P. A premature stop codon mutation in the 2B helix termination peptide of keratin 5 in a German epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara case. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 112(6): 988–90.
4. Aushev M., Koller U., Mussolino C. et al. Traceless targeting and isolation of gene-edited immortalized keratinocytes from epidermolysis bullosa simplex patients. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017; 6: 112–23.

Н.А. Арефьева¹, Ю.П. Джигоев², А.Ю. Борисенко², Ю.С. Букин³, Л.А. Степаненко², В.И. Чемерилов¹, В.П. Саловарова¹, А.А. Приставка¹, О.Ф. Вятчина¹, Г.В. Юринова¹, О.А. Секерина², В.И. Злобин²

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК И АНАЛИЗ СТРУКТУР CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ В ГЕНОМЕ ПЛАЗМИДЫ PBT1850294 ШТАММА *BACILLUS THURINGIENSIS* BT185

¹ ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

² ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

³ ФГБОУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

N.A. Arefieva¹, Y.P. Dzhioev², A.Y. Borisenko², Y.S. Bukin³, L.A. Stepanenko², V.I. Chemerilova¹, V.P. Salovarova¹, A.A. Pristavka¹, V.A. Kuz'minova¹, O.F. Vyatchina¹, G.V. Yurina¹, O.A. Sekerina², V.I. Zlobin²

BIOINFORMATIC SEARCH AND ANALYSIS OF CRISPR/CAS SYSTEM STRUCTURES IN PLASMID PBT1850294 OF *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAIN BT185

¹ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

³ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

arefieva.n4@gmail.com

Введение. *Bacillus thuringiensis* (Bt) — энтомопатогенная бактерия, продуцирующая кристаллические белковые токсины, используемые при создании инсектицидных препаратов [1]. По нашим неопубликованным данным в хромосоме штаммов Bt, представленных в базах данных GenBank и RefSeq, отсутствуют локусы CRISPR/Cas-системы. В 2017 г. была опубликована информация о наличии системы CRISPR/Cas в плазмиде штамма Bt. Аналогичная последовательность *cas*-генов была обнаружена в геномах плазмид и других штаммов, однако ее структурно-функциональные характеристики не были изучены [2].

Цель исследования — с помощью биоинформационных методов изучить структуру локусов CRISPR/Cas-системы в геноме плазмиды pBT1850294 штамма *Bacillus thuringiensis* Bt185.

Материал и методы. Материалом для исследования являлся геном плазмиды pBT1850294 (NZ_CP014284.1) размером 293705 п. н., из штамма *Bacillus thuringiensis* Bt185 (NZ_CP014282.1). Данный штамм был выделен из почвенных образцов провинции Хэбэй (Китай) в 2006 г. [3]. Для поиска CRISPR/Cas-систем и определения структурных и функциональных характеристик *cas*-генов были использованы методы программного моделирования Macromolecular System Finder, ver. 1.0.5 с установленными вспомогательными пакетами formatdb (ver. 2.7.1) и hmmer (ver. 3.1) [4]. Поиск CRISPR-кассет проводили на основе трех программных алгоритмов: «CRISPRDetect», «CRISPRFinder», «CRISPR Recognition Tool (CRT)» [5, 6, 7]. Идентификацию прото-спейсеров осуществляли с помощью алгоритма BLASTn по базам данных GenBank и RefSeq.

Результаты исследования и обсуждение. В геноме плазмиды pBT1850294 обнаружено два локуса

CRISPR/Cas-систем, отнесенных к подтипам I-B (локус 1, 4305 п.н.) и I-C (локус 2, 11102 п.н.). Расстояние между локусами составило 94680 п.н. Для *cas*-генов данных локусов получены структурные и функциональные характеристики. Вблизи локуса 1 CRISPR-кассет обнаружено не было. С обеих сторон от последовательности *cas*-генов локуса 2 расположены CRISPR-касеты. CRISPR-кассета 1 включает 11 спейсеров по 33–35 п.н. и 12 повторов по 32 п.н. В CRISPR-кассете 2 обнаружено 4 повтора по 32 п.н., разделенных 3 спейсерами по 34–35 п.н. Подобная последовательность *cas*-генов CRISPR/Cas-системы подтипа I-C была обнаружена в геноме плазмиды pFR260 штамма *B. thuringiensis* INTA Fr7-4, выделенного в Аргентине [2]. В результате анализа спейсерных последовательностей установлено полное соответствие трех спейсеров CRISPR-касеты-1 протоспейсерам фагов, специфичных к роду *Bacillus*.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о возможной утрате CRISPR/Cas-системы бактерией *B. thuringiensis* в ходе эволюции. Продолжение исследования позволит получить новую информацию об эволюции штаммов Bt, выделенных в разных географических зонах.

Литература:

1. Sanahuja G., Banakar R., Twyman R.M. et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 2011; 9(3): 283–300.
2. Navas L.E., Amadio A.F., Ortiz E.M. et al. Complete sequence and organization of pFR260, the *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4 plasmid harboring insecticidal genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(1): 43–54.
3. Li Y.Q., Shu C.L., Shan Y.M. et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Bt185, a potential soil insect biocontrol agent. *Journal of Integrative Agriculture* 2017; 16(3): 749–51.
4. Abby S.S., Néron B., Ménager H. et al. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS One* 2014; 9(10): e110726.
5. Bland C., Ramsey T.L., Sabree F. et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 209.
6. Biswas A., Staals R.H., Morales S.E. et al. CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics* 2016; 17: 356.
7. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(2): 52–7.

СДЗ

A.B. Bondarenko^{1,2}, M.N. Gordeev^{1,2},
A.P. Kukhareva^{2,3}

CRISPR/CAS9 MEDIATED KNOCKOUT OF INTERFERON-INDUCED TRANSMEMBRANE PROTEIN-3 (IFITM3) GENE

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

andrew.b.bondarenko@gmail.com

Introduction. The interferon-induced proteins (IFITMs) are a family of conservative proteins that consists of two transmembrane domains, cytoplasmic domain and have various short N- and C-terminal sites [1, 2]. Five *IFITM* genes have been identified in human genome. The molecular function of these proteins has been largely studied in cell culture systems, which led to identification of their antiviral properties by modifying cell adhesion [3]. Mostly IFITMs sequester incoming viral particles in endosomes by preventing their transfection. IFITM3 inhibit the majority of viruses and has been recently shown to play a role in human cancer development. But still the mechanisms of IFITM3 expression in cancer cells remain to be determined [4]. To study these processes special gene knockout cell lines need to be created. The present study therefore aimed to induce an IFITM3 gene knockout using CRISPR/Cas9 system in human adenocarcinoma A549 cells for further antiviral and cancer researches.

Material and Methods. For knocking out the expression of IFITM3 in A549 human lung carcinoma cells, the lentiCRISPRv2 backbone [5] was *Esp3I* digested and ligated with the double stranded gRNA sequences targeting the exon 1 and gene promoter. Lentiviral particles were produced through PEI-based HEK293T cells co-transfection with lentiCRISPRv2 (expressing sgRNAs targeting IFITM3 or empty vector as a control), pLP1, pLP2 and pLP/VSVG plasmids. Next, A549 cells were infected with these lentivirus particles, followed by puromycin (2 µg/ml) selection for 2 weeks to generate stable cell lines, which were then cloned by limited dilution in 96-well plates. Then, IFITM3 knockout efficiency in the IFN-α2b-treated clones was screened by immunofluorescent staining of fixed cells and western blot analysis of cell lysates using antibodies specific for IFITM1 (ab106265, Abcam), IFITM2 (12769-1-AP, Proteintech), IFITM3 (11714-1-AP, Proteintech) and alpha-tubulin (T6074, Sigma). To verify western blot results IFITM3-disturbed clones were confirmed using a PCR specific for each *IFITM* locus.

Results. Two of three sgRNAs were used to establish clonal cell lines and out of 12 tested clones the most of the clones did not express IFITM3 (absence of a band) as showed by western blot and immunofluorescence staining (absence of a fluorescence). Further analysis at the genomic level revealed expected deletion between the promoter region and exon 1 of the IFITM3 gene in several of the clones.

Discussion. The present study shows that CRISPR/Cas9 technology can be successfully used for efficient inhibition of IFITM3 in cell cultures.

Conclusions. A stable CRISPR/Cas9 mediated knock-out of IFITM3 in A549 cells might help to elucidate its role in the innate antiviral response, cell adhesion, tumorigenesis

and progression of cancers [6, 7]. Further functional studies using IFITM3 knockout cells are warranted to investigate the contribution of IFITM3 to interferon mediated inhibition of viruses and carcinogenesis regulation.

References:

1. Bailey C.C., Kondur H.R., Huang I., Farzan M. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 32184–93.
2. Weston S., Czieso S., White I.J. et al. A membrane topology model for human interferon inducible transmembrane protein 1. *PLoS One* 2014; 9(8): e104341.
3. Bailey C.C., Zhong G., Huang I.C., Farzan M. IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense. *Annu. Rev. Virol.* 2014; 1: 261–83.
4. Hu J., Wang S., Zhao Y. et al. Mechanism and biological significance of the overexpression of IFITM3 in gastric cancer. *Oncol. Rep.* 2014; 32: 2648–56.
5. Sanjana N.E., Shalem O., Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 2014; 11: 783–4.
6. Siegrist F., Ebeling M., Certa U. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *J. Interf. Cytokine Res.* 2011; 31: 183–97.
7. Zhang D., Wang H., He H. et al. Interferon induced transmembrane protein 3 regulates the growth and invasion of human lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* 2017; 8: 337–43.

СД4

А.Ю. Борисенко^{1*}, Ю.П. Джиоев¹,
Н.П. Перетолчина¹, Л.А. Степаненко¹,
В.М. Кузьмина², В.И. Злобин^{1**}

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ И СКРИНИНГ БАКТЕРИОФАГОВ ЧЕРЕЗ СПЕЙСЕРЫ CRISPR-КАССЕТ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

¹ НИИ биомедицинских технологий ФГБОУ
ВО «Иркутский государственный медицинский
университет», Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск,
Россия

A.Yu. Borisenko^{1*}, Yu.P. Dzhioev¹,
N.P. Peretolchina¹, L.A. Stepanenko¹,
V.M. Kusminova², V.I. Zlobin^{1**}

BIOINFORMATIONAL ANALYSIS OF CRISPR/ CAS SYSTEMS AND SCREENING OF BACTERIOPHAGES THROUGH THE SPACERS CRISPR-CASSETTE OF STRAINS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

¹ Research Institute of Biomedical Technologies
of Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

* 89500720225@mail.ru,

** vizlobin@mail.ru

Введение. В настоящее время стафилококковые инфекции остаются серьезной проблемой практической медицины [1, 2]. В связи с возникновением множественной устойчивостью *Staphylococcus aureus* к антибиотикам, актуальным становится поиск новых методов лечения инфекций [3, 4]. В последние годы в геноме бактерий была открыта CRISPR-система

(англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — это прямые повторы, разделенные варибельными участками ДНК, спейсерами. Спейсеры соответствуют по нуклеотидной последовательности определенным фрагментам ДНК чужеродных генетических элементов (протоспейсерам), которые совместно с ассоциированными генами (англ. *CRISPR-associated genes*) обеспечивают защиту клетки от чужеродных ДНК. Скрининг спейсеров с помощью биоинформационных методов позволяет определить степень устойчивости бактерий к специфичным фагам и плазмидам [5, 6].

Цели исследования — поиск CRISPR/Cas-систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* из базы данных GenBank и анализ бактериофагов, выявленные через расшифрованные спейсерные последовательности CRISPR-кассет анализируемых штаммов.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовались геномы штаммов *S. aureus* из базы данных GenBank: KB822075.1, CPO07447.1, FN433596.1, CPO09681.1, NZ_JXZM01000001.1. Для поиска CRISPR/Cas-систем использовались методы моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2). Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались: PILER-CR, CRISPI и CRISPRFinder. Для поиска фагов через расшифрованные спейсерные последовательности использовали приложение CRISPRTarget, Mycobacteriophage Database и Phages database.

Результаты исследования и обсуждение. В результате анализа геномов *S. aureus* было выяснено, что CRISPR-система относится к IIIA типу. При помощи MacSyFinder удалось обнаружить структурные гены CRISPR: нуклеазные гены (*cas1*, *cas2*); RAMP семейства PHKaz, участвующих в обработке *crRNA* (*cas6*); малых и больших субъединиц (*cas10*, *cas2*); Cascade субъединиц (*cas3*, *cas4*, *cas5*) и регуляторов транскрипции (*cas6*). Для поиска CRISPR-кассет в геномах использовались три программных алгоритма поиска: PILER-CR, CRISPI и CRISPRFinder, которые позволили получить наборы компонентов кассет: повторы и спейсеры, перекрывающихся в 30 фрагментах. На основании трех программных совпадений по каждому участку были обнаружены до 29 повторов и до 27 спейсерных участков. Спейсеры были размером от 32 до 49 н.о., разделенные повторами длиной 32 н.о., имеющих следующую структуру последовательностей: GATCGATAACTACC CCGAAGAATAGGGGACGA. Полученные спейсерные участки были проанализированы через поисковые программные приложения: *Mycobacteriophage Database*, *Phages*, CRISPRTarget. Были идентифицированы фаги, в которых выявлены идентичные спейсерам CRISPR-кассет *S. aureus* протоспейсерные участки, по которым определялась их видовая принадлежность к следующим родам бактерий: *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*.

Выводы. На основании полученных результатов посредством использования биоинформационных технологий выяснено, что продемонстрированный программный алгоритм позволяет выявлять локусы CRISPR/Cas-систем в геномах бактерий, а также оценивать степень их устойчивости к чужеродным генетическим элементам (бактериофагам, плазмидам). Используемые программы позволили выявить структуры и позиции *cas*- и *casM*-генов, установлен тип CRISPR/*cas*-системы бактерии (IIIA тип). Выявлено, что на анализируемые штаммы *S. aureus* наибольшее генетическое влияние оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*.

Литература:

1. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотико-резистентных грамположительных микроорганизмов. Инфекции и антимикробная терапия 2003; 5(2): 48–54.
2. Фалова О.Е., Потатуркина-Нестерова Н.И., Ильина Е.Н. Взаимосвязь внутривидового разнообразия и генетических детерминант патогенности стафилококков кожи. Фундаментальные исследования 2013; 12(1): 131–4.
3. Борисенко А.Ю., Джигоев Ю.П., Парамонов А.И. и др. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*. Сибирский медицинский журнал (Иркутск) 2015; (2): 71–4.
4. Benda C., Ebert J., Scheltema R.A. et al. Structural model of a CRISPR RNA-silencing complex reveals the RNA-target cleavage activity in Cmr4. Mol. Cell 2014; 56: 43–54.
5. Barrangou R., Marraffini L.A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol. Cell 2014; 54: 234–44.
6. Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S. et al. CRISPRTarget bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. RNA Biol. 2013; 10(5): 817–27.

СД5

С.А. Васильев^{1*}, Р.Р. Савченко¹, В.С. Фишман²,
А.А. Мурашкина³, А.А. Зарубин¹, М.Ю. Вилкова⁴,
М.Е. Лопаткина¹, И.Н. Лебедев¹

**ВЛИЯНИЕ ПРОТЕИНАЗЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА ADAMTS1 НА РЕГУЛЯЦИЮ
РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОГО
ОТВЕТА В НОКАУТНОЙ МОДЕЛЬНОЙ
СИСТЕМЕ IN VITRO**

¹ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

² Институт цитологии и генетики СО РАН

³ Национальный исследовательский Томский
государственный университет

⁴ Сибирский государственный медицинский
университет

S.A. Vasilyev^{1*}, R.R. Savchenko¹, V.S. Fishman²,
A.A. Murashkina³, A.A. Zarubin¹, M. Yu. Vilkova⁴,
M.E. Lopatkina¹, I.N. Lebedev¹

**EFFECT OF EXTRACELLULAR MATRIX
PROTEINASE ADAMTS1 ON THE REGULATION
OF RADIATION-INDUCED RESPONSE IN THE
KNOCKOUT MODEL SYSTEM IN VITRO**

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRCM

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS

³ National Research Tomsk State University

⁴ Siberian State Medical University

*stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Воздействие ионизирующего излучения вызывает значительные функциональные изменения в клетках человека, выражающиеся в активации различных сигнальных путей и транскрипционного ответа множества генов. В последнее время все большая роль в ответе на повреждение ДНК отводится сигнальным путям, включающим взаимодействие с межклеточным матриксом и паракриновый сигналинг. Более того, некоторые авторы даже приводят исследования роли матрикса в списке ключевых направлений, определяющих будущее радиобиологии [1]. На важную роль межклеточного матрикса указывают и наши предварительные

результаты. Проведенный нами полнотранскриптомный анализ в лимфоцитах индивидов с различной эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК показал, что большинство дифференциально-экспрессирующихся генов задействованы в сигнальных путях, а не напрямую в репарации ДНК, а наиболее значимые различия между группами были обнаружены по экспрессии гена ADAMTS1, кодирующего протеиназу межклеточного матрикса. Поэтому целью настоящего исследования стал анализ влияния ADAMTS1 на регуляцию ответа на повреждение ДНК в нокаутной модельной системе *in vitro*.

С помощью системы CRISPR/Cas9 в опухолевой клеточной линии HeLa были введены короткие инделы в первый экзон гена ADAMTS1. Анализ с помощью массового параллельного секвенирования показал наличие мутаций сдвига рамки считывания на обеих аллелях, что указывает на успешный нокаут гена ADAMTS1. В полученной клеточной линии были проведены следующие эксперименты: анализ клональной выживаемости после воздействия γ -излучением в дозе 2–10 Гр, оценка уровня фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК и частоты микроядер, полнотранскриптомный анализ дифференциально-экспрессирующихся генов в необлученных и облученных клетках (2 Гр) с помощью экспрессионных микрочипов (Agilent Technologies) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa. Эксперименты проведены в трех повторностях.

Было обнаружено, что нокаут гена ADAMTS1 снижает клональную выживаемость клеток после воздействия ионизирующим излучением в дозе 2 Гр (в 1,9 раза, $p = 0,014$). Кроме того, в необлученных клетках с нокаутом гена ADAMTS1 отмечалось повышение частоты микроядер ($21,7 \pm 7,5 \%$) по сравнению с исходной клеточной линией HeLa ($5,0 \pm 1,0 \%$, $p = 0,019$), но не наблюдалось повышения уровня фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК γ H2AX и 53BP1. Анализ с помощью экспрессионных микрочипов показал, что нокаут гена ADAMTS1 приводит к снижению экспрессии самого гена ADAMTS1 (в 2,3 раза), а также генов, участвующих в ответе на абиотические стимулы (GO:0009628), включая гены JUN, FOS, FOSB. Это может быть связано со снижением эффективности ответа на воздействие ионизирующего излучения и повреждения ДНК. Значимо обогащенных групп среди генов с повышенной экспрессией в клетках с нокаутом ADAMTS1, обнаружено не было. В клетках после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр среди генов с повышенной экспрессией с помощью инструмента STRING был выявлен кластер генов, связанных с репарацией двунитевых разрывов ДНК: ATR, MSH6, FANCI, ERCC5, EID3, ATRX, HEATR5A, BOD1L1, TET2. Это может указывать на то, что в клетках с нокаутом ADAMTS1 возрастание уровня двунитевых разрывов ДНК приводит к необходимости повышения экспрессии генов их репарации.

Таким образом, металлопротеиназа межклеточного матрикса ADAMTS1, по-видимому, участвует в регуляции ответа на повреждение ДНК в нокаутной модельной системе *in vitro*, приводя к изменению как транскрипционной активности различных генов сигналинга и репарации ДНК, так и эффективности репарации ДНК и клеточной радиочувствительности.

Исследование проведено при поддержке Гранта Президента РФ № МК-5944.2018.4.

Литература:

1. Kirsch D. G., Diehn M., Kesarwala A. H. et al. The Future of Radiobiology 2018. J. Natl. Cancer Inst. 110(4): 329–40.

СД6

А.С. Гольцова^{1*}, Э.Б. Дашинимаев^{2,3**}**МОДЕЛИРОВАНИЕ CCR5Δ32 МУТАЦИИ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9**¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия² Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, РоссияA.S. Goltsova^{1*}, E.B. Dashinimaev^{2,3**}**CRISPR/CAS9-MEDIATED CCR5Δ32 MUTATION IN HUMAN CELLS**¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia² Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

*goltsova.aleksandra29@gmail.com,

**dashinimaev@gmail.com

Введение. Одним из ко-рецепторов связывания вируса иммунодефицита человека с целевой иммунной клеткой является трансмембранный белок CCR5 (C-C рецептор хемокина 5). Существует и описана популяция людей с мутацией CCR5-Δ32, заключающейся в делеции 32-х нуклеотидов в последовательности гена, кодирующего CCR5, приводящей к сдвигу рамки считывания. Данная мутация в гетерозиготном состоянии значительно снижает риск инфицирования ВИЧ, в гомозиготном — заражение становится практически невозможным [1, 2]. Учитывая последние успехи биомедицины и молекулярной биологии в области систем редактирования генома, становятся актуальными исследования по моделированию и изучению данной мутации в различных клетках человека. Целью данной работы является оптимизация системы CRISPR/Cas9 для создания CCR5-Δ32 мутации в различных клетках человека.

Материал и методы. Работа проводилась на линиях клеток MT-4 (Т-клеточная лимфома), IPS-KYOU-DXRO109B (ATCC #ACS-1023™, индуцированные плюрипотентные клетки) и 1608-hT (иммортиализованные фибробласты кожи). В клетки трансфицировали генетические конструкторы, кодирующие нуклеазу Cas9 и гидовую РНК против участка гена CCR5. Конструкторы также содержали элементы, кодирующие флуоресцентные маркеры EGFP и TagRFP, необходимые для дальнейшего сортирования клеток. Сортированные клетки далее клонировались методом предельных разведений, и впоследствии полученные клоны анализировали при помощи обычной и цифровой ПЦР, а также HRM-анализа. Для подтверждения полученных данных использовали методы капиллярного электрофореза и секвенирования по Сэнгеру.

Результаты исследования и обсуждение. В ходе проведения работы нами были подобраны оптимальные условия для трансфекции генетических конструкторов в клетки человека методом электропорации, учитывающие максимальную выживаемость клеток и эффективность попадания конструкторов. Нами был получен ряд клональных линий клеток человека (Т-клеточной лимфомы, ИПСК, фибробластов кожи), в которых была искусственно создана делеция 32 нуклеотидов в четвёртом экзоне

гена CCR5, аналогично природной мутации CCR5-Δ32, что подтверждается проведёнными анализами. Было показано, что использование стратегии с двумя гидовыми РНК системы CRISPR/Cas9 позволяет получать планируемые крупные делеции в геномной ДНК.

Выводы. Таким образом, система редактирования генома CRISPR/Cas9 может использоваться для создания CCR5-Δ32 мутации в различных клетках человека, что в итоге может привести к появлению инновационных методов лечения людей с синдромом приобретённого иммунодефицита при ВИЧ-инфекциях. Необходимы дальнейшие исследования для проверки эффективности и off-target активности.

Работа была выполнена в рамках государственного задания ИБР РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» № 0108-2018-0004.

Литература:

1. Hütter G., Nowak D., Mossner M. et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 692–7.
2. Kang X., He W., Huang Y. et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR / Cas-mediated genome editing. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33(5): 581–8.

СД7

Е.В. Григорьева^{1–4}, А. Сурумбаева^{1,2,4}, Т.Б. Маланханова^{1–4}, С.В. Павлова^{1–3}, С.П. Медведев^{1–4}, А.А. Малахова^{1–4}, С.М. Закиан^{1–4}**ПОЛУЧЕНИЕ АСТРОЦИТОВ ИЗ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, НЕСУЩИХ РЕПОРТЁРНУЮ КОНСТРУКЦИЮ GFAP-RFP**¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия³ ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, РоссияE.V. Grigor'eva^{1–4}, A. Surumbayeva^{1,2,4}, T.B. Malankhanova^{1–4}, S.V. Pavlova^{1–3}, S.P. Medvedev^{1–4}, A.A. Malakhova^{1–4}, S.M. Zakian^{1–4}**OBTAINING OF ASTROCYTES FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL LINES BEARING GFAP-RFP REPORTER CONSTRUCTION**¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² "E. Meshalkin National Medical Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

evlena@bionet.nsc.ru

Введение. Десятилетия патологических и физиологических исследований нейродегенеративных расстройств были сосредоточены на прогрессирующей гибели нейронов, но очевидно, что астроциты также играют важную роль в процессе дегенерации. Астроциты представляют собой специализированные клетки, составляющие значительную часть популяции клеток центральной нервной системы (ЦНС). Вместе с олигодендроцитами они образуют глию ЦНС и выполняют незаменимые функции в гомеостазе нейронов и регуляции синаптической пластичности. Участие астроцитов в невропатологии этих заболеваний, вероятно, является следствием как потери нормальных гомеостатических функций, так и усиления токсических функций [1].

Настоящая революция в создании моделей нейродегенеративных заболеваний произошла с появлением технологий получения, культивирования и направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) [2].

Однако ключевой проблемой в процессе дизайна клеточной модели является получение чистых линий целевых типов клеток. Несовершенство протоколов дифференцировки ИПСК приводит лишь к 30% выходу релевантных типов клеток. Решением этой проблемы может стать отбор целевых типов клеток с использованием интегрированных в геном клеток генов флуоресцентных репортеров, которые помогают осуществлять визуализацию экспрессии специфических генов-маркеров. В настоящей работе был использован репортерный ген *RFP*, маркирующий экспрессию астроцит-специфического гена *GFAP*.

Материал и методы. Трансген флуоресцентного белка RFP интегрировали в локус *GFAP* линии ИПСК iMA-1L, заместив стоп-кодон последовательностью 2A-пептида, предваряющей кодирующую область гена *RFP*. Внесение трансгена в геном проводили путем гомологичной рекомбинации с донорной плазмидной конструкцией, содержащей плечи гомологии к 3'-концу гена *GFAP*, фланкирующие последовательности 2A-пептида, гена *RFP* и селективного гена *PuroR*. Для повышения эффективности гомологичной рекомбинации использовали систему CRISPR/Cas9. Отбор рекомбинантных клонов ИПСК проводили путем селекции пурамицином с последующим ПЦР-анализом встройки. Правильность встройки трансгена и отсутствие сдвигов рамки считывания подтверждали секвенированием.

Направленную дифференцировку ИПСК в астроглиальные клетки проводили через образование эмбрионидных телец согласно протоколу [3]. На первом этапе ИПСК дифференцировали в нейроэпителиальные (нейральные стволовые) клетки. В течение следующих 2 месяцев происходил переход нейральных стволовых клеток в астроглиальные предшественники с образованием незрелых астроцитов.

Визуализацию экспрессии RFP проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и подтверждали ОТ-ПЦР.

Результаты исследования. Иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных клеток показал наличие экспрессии нейральных маркеров (NF200, MAP2, NESTIN) и маркеров астроцитов (S100 β и GFAP). Несмотря на экспрессию GFAP, свечения RFP не наблюдалось, однако ОТ-ПЦР анализ выявил наличие РНК-продукта гена *RFP* в дифференцированных производных.

Обсуждение. Отсутствие флуоресцентного свечения дифференцированных клеток, вероятно, связано

с низким уровнем экспрессии гена *GFAP*, недостаточным для регистрации свечения репортера с помощью флуоресцентной микроскопии.

Выводы. Наличие РНК-продукта подтверждает состоятельность предложенной идеи интеграции гена-репортера через 2A-пептид непосредственно за маркерным геном, однако необходимо пересмотреть способ визуализации экспрессии маркера.

Работа поддержана программой Президиума РАН № 44, создание плазмидных конструкций проводилось за счет программы РАН II.2П/VI.60-2 № 0324-2016-0033. Получение линий ИПСК проводилось за счет РНФ № 16-15-10128.

Литература:

1. Phatnani H., Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015; 7(6): a020628.
2. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131(5): 861–72.
3. Krencik R., Zhang S.C. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. Nat. Protoc. 2011; 6(11): 1710–17.

СДВ

Г.И. Давлетшина^{1,3}, В.В. Шерстюк¹⁻⁴,
С.М. Закиян¹⁻⁴

АНАЛИЗ ВКЛАДА МИКРОРНК В ПРОЦЕСС РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КРЫСЫ

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

G.I. Davletshina^{1,3}, V.V. Sherstyuk¹⁻⁴, S.M. Zakian¹⁻⁴

ANALYSIS OF THE MICRORNA CONTRIBUTION TO THE PROCESS OF RAT SOMATIC CELLS REPROGRAMMING

¹ The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

davlet15628@gmail.com

Введение. В настоящее время популярной и очень актуальной темой является изучение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), при помощи которых возможно изучение не только прикладных вопросов науки, но и фундаментальных. ИПСК являются моделью для изучения процессов

дифференцировки клеток и плюрипотентного состояния, а также возможно их применение в заместительной клеточной терапии. Несмотря на то, что процесс репрограммирования к плюрипотентному состоянию является глубоко изученным, до сих пор остаются вопросы, касающиеся участия микроРНК в данном процессе. МикроРНК — это малые некодирующие РНК, участвующие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Неоднократные исследования на человеке и мыши доказывают, что некоторые микроРНК принимают активное участие в репрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию. Однако такие исследования еще не проводили на крысе, несмотря на то, что она является важным объектом биомедицины. Ранее мы провели полногеномное секвенирование малых РНК в ИПСК, ЭСК и фибробластах крысы и установили, что группа, состоящая из 14 микроРНК: miR-743a, miR-743b, miR-742, miR-883, miR-471, miR-3551, miR-741, miR-463, miR-880, miR-878, miR-881, miR-871, miR-3580, miR-465, которые расположены на X хромосоме, характеризуется повышенной экспрессией в ИПСК относительно фибробластов. Некоторые из этих микроРНК встречаются в геноме мыши, но их функции не известны. В связи с этим мы выдвинули гипотезу о том, что данная группа микроРНК участвует в процессе репрограммирования к плюрипотентному состоянию или в его поддержании. Для подтверждения данной гипотезы мы получили линии фибробластов самцов крысы с 5 вариантами делеций различных участков ДНК, в которых расположены исследуемые микроРНК.

Материал и методы. Для получения делеций использовали систему редактирования генома CRISPR/Cas9, при помощи которой возможно получение различных хромосомных аббераций, в том числе и протяженных делеций.

Результаты исследования и обсуждение. Были получены делеции длиной от 3 и до 45 т.п.н. Линию фибробластов с делецией всех 14 микроРНК репрограммировали к плюрипотентному состоянию с помощью сверхэкспрессии основных факторов плюрипотентности. В результате было показано, что эффективность репрограммирования фибробластов с нокаутом была значительно снижена относительно клеток дикого типа. Это говорит о том, что делеция участка, содержащего все 14 исследуемых микроРНК, отрицательно влияет на процесс репрограммирования фибробластов крысы. Жизнеспособность клеток, полученных в процессе репрограммирования фибробластов с нокаутом 14 микроРНК, зависит от экзогенной экспрессии основных факторов плюрипотентности, и они не способны образовывать компактные колонии, характерные для плюрипотентных стволовых клеток крысы, что, вероятно, говорит нам о недорепрограммированном состоянии. В клетках с делецией, при помощи полуквантитативного ПЦР, подтвердили отсутствие экспрессии исследуемых микроРНК и сравнили уровень экспрессии основных факторов плюрипотентности с их уровнем в ЭСК и ИПСК дикого типа.

Выводы. Таким образом, можно утверждать, что делеция участка ДНК, в котором расположены исследуемые микроРНК, ингибирует процесс репрограммирования фибробластов крысы к плюрипотентному состоянию. Дальнейшее изучение функции данных микроРНК позволит нам более полно понять процесс репрограммирования и выявить новые механизмы его регуляции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10084.

СД9

S.D. Dangol^{1*}, M.E. Caliskan¹,
A. Barakate², A. Bakhsh^{1**}

KNOCKOUT OF POTATO INVERTASE INHIBITOR GENE BY CRISPR/CAS9 BASED APPROACH

¹ Department of Agricultural Genetic Engineering,
Faculty of Agricultural Science and Technologies,
Nigde Omer Halisdemir University, Nigde, Turkey

² Cell and Molecular Sciences, The James Hutton
Institute, Invergowrie, Dundee, United Kingdom

* sarbesh_dangol@outlook.com,

** abthebest@gmail.com

Cell-wall invertase (CWIN) enzyme activity has been associated with the defense mechanism during the pathogen infection. Potato invertase inhibitor enzyme might be involved in alteration of CWIN and/or possibly vacuolar invertase (VIN) enzyme levels, which can be demonstrated by CRISPR/Cas9 based knockout studies. The possible role of invertase inhibitor gene (Inv-Inh) in plant host defense mechanisms studies will place this study in a powerful position to determine its role in potato defense mechanism against various pathogens. This will represent a major advance in comprehending host-pathogen interaction in potato for future studies, its associated pathogenesis and host defense mechanisms. In present study, we have designed and cloned two single guided RNAs (sgRNAs) specific to Inv-Inh gene in CRISPR vector to knock this gene out based on the sequence information obtained diploid and tetraploid potato cultivars. Furthermore, sgRNA-cloned CRISPR vector will be transferred to the diploid and tetraploid potato cultivars via Agrobacterium-mediated plant transformation. This research will generate invertase inhibitor gene edited potato plants as verified by sequencing data information, and the mutational efficacy of CRISPR/Cas9 technology will also be undertaken.

We thank TUBITAK 2215 for providing fully-funded PhD scholarship to Mr. Sarbesh Das Dangol.

СД10

Э.Б. Дашинимаев^{1,2}, А.С. Артюхов^{2,3},
Н.В. Мещерякова^{2,5}, Ю.С. Василенко^{1,2},
А.С. Гольцова⁴, Д.М. Щепетов¹,
Е.А. Воротеяк^{1,2,4}, А.В. Васильев^{1,4}

НОКАУТ ГЕНОВ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 И ОТБОР МУТАНТНЫХ КЛОНОВ ПРИ ПОМОЩИ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт,
Долгопрудный, Россия

⁴ Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Российский университет дружбы народов, Москва,
Россия

E.B. Dashinimaev^{1,2}, A.S. Artyuhov^{2,3},
N.V. Meshcheryakova^{2,5}, Y.S. Vasilenko^{1,2},
A.S. Goltsova⁴, D.M. Schepetov¹,
E.A. Vorotelyak^{1,2,4}, A.V. Vasiliev^{1,4}

GENES KNOCKOUT IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH CRISPR/CAS9 AND CLONES SELECTION USING DROPLET DIGITAL PCR

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ RUDN University, Moscow, Russia

dashinimaev@gmail.com

Введение. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека являются перспективным ресурсом клеток для нужд регенеративной биомедицины, поскольку ИПСК можно дифференцировать практически во все типы стволовых и прогениторных клеток взрослого организма. В связи с бурным развитием систем редактирования генома, а именно CRISPR/Cas9, стали актуальны методы нокаутирования различных генов в культурах клеток, в том числе и в ИПСК. Так, например, нокаут некоторых генов в ИПСК поможет скорректировать некоторые заболевания при последующих клеточных трансплантациях. Однако, учитывая ряд особенностей ИПСК *in vitro*, например, низкую эффективность трансфекции, крайне низкую способность к клонированию малым разведением, а также их свойство расти в плотных колониях, получение отдельных клонированных линий ИПСК с нужной мутацией представляет собой определенную проблему.

Материал и методы. Для отработки метода нокаута генов в ИПСК человека были использованы генетические конструкции, кодирующие компоненты CRISPR/Cas9, а также гены флуоресцентных белков, и линия ИПСК человека IPS-KYOU-DXRO109B (ATCC #ACS-1023™).

Результаты исследования. В результате данного исследования мы отработали несколько методов, применяемых в экспериментальной клеточной биологии, таких как доставка генетических конструкторов в клетки при помощи электропорации, обогащение трансфицированных клеток методом клеточного сортирования, клонирование ИПСК предельным разведением, поиск мутантных клонов при помощи ПЦР анализа, анализ плавления высокого разрешения (HRM), капиллярный электрофорез, а также цифровая капельная ПЦР. В итоге, нами был получен ряд линий ИПСК с мутантными аллелями генов *APP*, *CCR5*, *RUNX1*, *RCAN1*, *ASIC1*, *TNFA1R* и др.

Выводы. Таким образом, нами был собран и провалирован протокол получения линий ИПСК с нокаутрованными генами. Мы надеемся, что данный протокол будет востребован исследователями в их работе при экспериментах с ИПСК человека.

Работа была поддержана грантом Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» № О108-2018-0004.

СД11

Е.В. Дементьева¹⁻³, С.П. Медведев¹⁻⁴,
В.Р. Коваленко¹⁻⁴, Ю.В. Вяткин⁵, Е.И. Кретов²,
М.М. Слотвицкий⁶, Д.Н. Штокало⁵,
Е.А. Покушалов², С.М. Закиан¹⁻⁴

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ, С ПОМОЩЬЮ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВОВЫХ КЛЕТОК

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ ООО Новые программные системы, Новосибирск, Россия

⁶ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

E.V. Dementyeva¹⁻³, S.P. Medvedev¹⁻⁴,
V.R. Kovalenko¹⁻⁴, Yu.V. Vyatkin⁵, E.I. Kretov²,
M.M. Slotvitsky⁶, D.N. Stokalo⁵, E.A. Pokushalov²,
S.M. Zakian¹⁻⁴

STUDYING IMPACT OF MUTATIONS IN GENES ASSOCIATED WITH INHERITED HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY USING PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ Novel Software Systems, Novosibirsk, Russia

⁶ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

dementyeva@bionet.nsc.ru

Введение. Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является одним из самых распространенных сердечно-сосудистых заболеваний и встречается с частотой 1 случай на 500 человек. Около 50% случаев ГКМП обусловлены мутациями в генах, кодирующих, главным образом, саркомерные белки [1]. Однако механизм действия данных мутаций в настоящее время недостаточно изучен. Технология получения кардиомиоцитов в результате направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с мутациями в генах, ассоциированных с наследственной ГКМП, открывают новые возможности для создания моделей ГКМП и изучения влияния мутаций на развитие данного заболевания. Показано, что полученные таким образом кардиомиоциты способны воспроизводить такие признаки ГКМП, как увеличенный размер, дезорганизация саркомеров, нарушенная динамика

внутриклеточных потоков ионов кальция, обусловленная неправильной работой саркоплазматического ретикулула, и склонность к аритмическим событиям.

Материал и методы. Поиск мутаций у пациентов проводился с помощью массового параллельного секвенирования клинического экзона (5300 генов). Для получения ИПСК моноклеарные клетки пациентов с ГКМП репрограммировали к плюрипотентному состоянию путем нуклеофекции эписомными векторами, экспрессирующими гены *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC* и *LIN28*. Направленную дифференцировку ИПСК в кардиомиоциты проводили согласно протоколу, основанному на модуляции сигнального пути WNT [2]. Оценку динамики потоков ионов кальция в кардиомиоцитах осуществляли с помощью кальций-зависимого флуоресцентного красителя fluo-4, AM (Thermo Fisher Scientific).

Результаты исследования и обсуждение. В результате массового параллельного секвенирования клинического экзона у пациента с ГКМП была выявлена мутация p.R326Q в гене *MYBPC3*, который является одним из наиболее часто ассоциированных с наследственной ГКМП. Были получены и охарактеризованы ИПСК данного пациента. ИПСК пациента, а также ИПСК здорового донора были дифференцированы в кардиомиоциты. В обоих случаях появление спонтанных сокращений наблюдалось на 8–9-ый дни дифференцировки. Около 40–50% дифференцированных клеток экспрессировали кардиальный тропонин Т — саркомерный белок кардиомиоцитов. Более 90% полученных кардиомиоцитов, помимо кардиального тропонина Т, экспрессировали вентрикулярную форму регуляторной легкой цепи бета-миозина. Однако в сравнении с кардиомиоцитами, полученными из ИПСК здорового донора, кардиомиоциты, полученные при дифференцировке ИПСК пациента с ГКМП демонстрировали более высокую амплитуду выбросов ионов кальция из саркоплазматического ретикулула, нерегулярную динамику чередования выбросов ионов кальция и их обратного захвата, более продолжительный по времени захват ионов кальция саркоплазматическим ретикулулом и повышенное содержание ионов кальция в цитоплазме кардиомиоцитов на стадии покоя.

Выводы. Таким образом, кардиомиоциты, полученные в результате направленной дифференцировки ИПСК пациента с мутацией p.R326Q в гене *MYBPC3* проявляли такой ранний признак ГКМП, как нарушение динамики потоков ионов кальция.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 18-75-10039).

Литература:

1. Maron B.J. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002; 287: 1308–20.
2. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 2014; 11(8): 855–60.

СД12

П.И. Дерябин, А.А. Грюкова, А.Н. Шатрова,
Н.Н. Никольский, А.В. Бородинкина

ЭФФЕКТИВНОЕ И НАПРАВЛЕННОЕ УПРАВЛЕНИЕ СЕКРЕТОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ И CRISPR-МОДЕЛИРУЕМАЯ СЕКРЕТОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

P.I. Deryabin, A.A. Griukova, A.N. Shatrova,
N.N. Nikolsky, A.V. Borodkina

EFFECTIVE AND PRECISE MANAGING OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS' SECRETOME: OPTIMIZATION OF LENTIVIRAL TRANSDUCTION PARAMETERS AND CRISPR-BASED SECRETOME ENGINEERING

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

pavel_deryabin@list.ru

Введение. Согласно современной точке зрения, терапевтические эффекты при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК) во многом опосредуются их паракринной активностью, а именно секрецией различных трофических и регуляторных факторов, ответственных за иммуномодуляцию, ангиогенез, антиапоптотическую и противовоспалительную функции [1, 2]. Этот факт, а также развитие методов специфического управления экспрессией генов при помощи наводимых нуклеаз открывают новые перспективы высокотехнологичного использования МСК как «продуцентов» факторов заданного состава для достижения более выраженных терапевтических эффектов [2]. Технически наиболее сложными этапами генетической модификации МСК являются доставка трансгенов в клетки и обеспечение их продолжительной экспрессии [3]. В связи с этим настоящая работа направлена на разработку оптимального протокола лентивирусной трансдукции МСК и специфичной модуляции состава их секретомы на основе CRISPR-технологий.

Материал и методы. В работе были использованы МСК эндометрия человека (эМСК), соответствующие критериям Международного общества по клеточной терапии [4]. Для оптимизации параметров лентивирусной трансдукции использовали вспомогательные агенты полибрен (Pb) и протамин сульфат (Ps). Оценка свойств инфицированных клеток производилась по изменению профиля экспрессии CD-маркеров, пролиферации, размера клеток (проточная цитометрия), миграционной способности (xCELLigence), способности дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и децидуальном направлениях (Alizarin Red/Oil Red окрашивание, ИФА). Анализ клеточного старения осуществляли при помощи X-Gal окрашивания и иммуноблоттинга. Для модификации секретомы эМСК были использованы лентивирусные системы CRISPR/Cas9 GeCKO (для нокаута) и CRISPR/Cas9 SAM (для трансактивации) [5]. Кондиционная среда, собранная от модифицированных клеток, была сконцентрирована и проанализирована при помощи иммуноблоттинга. Статистический анализ проводился при помощи t-критерия Стьюдента и Вилкоксона.

Результаты исследования. Применение Pb при инфекции эМСК приводило к замедлению их пролиферации, снижению миграционной активности, нарушению способности к дифференцировке, а также появлению типичных маркеров клеточного старения в части популяции. Напротив, инфекция эМСК с применением Ps не имела значительного негативного влияния на основные свойства клеток. На основе оптимизированного протокола трансдукции эМСК при помощи CRISPR-систем были успешно получены линии plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)-нокаутных and PAI-1-оверэкспрессирующих эМСК. Изменение состава кондиционных сред, полученных от таких клеток, было верифицировано методом иммуноблоттинга.

Обсуждение. Негативное влияние Pb на свойства инфицируемых клеток отмечалось многими авторами, однако природа наблюдаемых эффектов оставалась неустановленной [6, 7]. В настоящей работе мы показали, что использование Pb приводит к запуску клеточного старения в части популяции.

Большинство существующих работ по генетической модификации МСК было проведено с использованием механизма РНК-интерференции или оверэкспрессии кДНК [3]. По сравнению с этими подходами технологии наводимых нуклеаз, и CRISPR-систем в частности, позволяют проводить как полное подавление экспрессии генов интереса, так и избегать сложностей работы с библиотеками кДНК и их клонированием в вектора [5]. В данной работе мы используем наиболее актуальные CRISPR-системы и демонстрируем эффективность выбранного подхода для направленной модуляции секретомы МСК.

Выводы. Установлено, что применение Pb при лентивирусной трансдукции эМСК негативно влияет на основные свойства стволовых клеток и приводит к запуску старения в части популяции. Разработан протокол эффективной лентивирусной трансдукции эМСК с использованием Ps. Впервые применены CRISPR-технологии для направленной модуляции секретомы стволовых клеток человека.

Литература:

1. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S. et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 1852.
2. Tran C., Damaser M.S. Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 82–83: 1–11.
3. Shearer R.F., Saunders D.N. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. *Genes Cells.* 2015; 1: 1–10.
4. Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P. et al. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. *Tsitologiya* 2011; 53: 919–29.
5. Joung J., Konermann S., Gootenberg J.S. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat. Protoc.* 2017; 4: 828–63.
6. Lin P., Correa D., Lin Y. et al. Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. *PLoS One* 2011; 6: e23891.
7. Nanba D., Matsushita N., Toki F. et al. Efficient expansion of human keratinocyte stem/progenitor cells carrying a transgene with lentiviral vector. *Stem Cell Res. Ther.* 2013; 4: 127.

СД13

А.М. Зайдман¹, Н.Ю. Пахомова¹, Е.Л. Строкова¹,
Е.Л. Черноловская², А.И. Шевченко^{2–4},
П.П. Лактионов^{2, 4}, В.М. Субботин⁵

ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕНА PAX3 ЛИПОФИЛЬНЫМИ siRNA В СКЛЕРОТОМЕ — МОДЕЛЬ ИДИОПАТИЧЕСКОГО СКОЛИОЗА НА КУРИНОМ ЭМБРИОНЕ

¹ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

⁵ Питтсбургский университет, Питтсбург, США

A.M. Zaidman¹, N.Yu. Pakhomova¹, E.L. Strokovaya¹,
E.L. Chernolovskaya², A.I. Shevchenko^{2–4},
P.P. Laktionov^{2, 4}, V.M. Subbotin⁵

INHIBITION OF PAX3 GENE BY LIPOPHILIC SIRNA IN SCLEROTOME AS A MODEL OF IDIOPATHIC SCOLIOSIS ON A CHICKEN EMBRYO

¹ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁵ University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, USA

AZaidman@niito.ru

Введение. Впервые в мировой практике на 50 больных с верифицированным диагнозом идиопатический сколиоз установлено [1]: этиологическим фактором сколиотической болезни является эктопическая локализация в пластинках роста тел позвонков клеток, производных нервного гребня, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и процессу роста. Нарушение морфогенеза позвоночника в раннем эмбриогенезе реализуется на стадиях роста в сколиотическую болезнь с клиническими вариантами течения. В продолжение исследований для ответа на ряд сформулированных гипотез поставлена цель: создание модели сколиотической болезни на курином эмбрионе путем ингибирования в склеротоме экспрессии гена *Pax3* интерферирующими липофильными siRNA (разработка лаборатории химии ИХБФМ СО РАН).

Материал и методы. Эффективность ингибирования транскрипции гена *Pax3* липофильной siRNA исследовали на культуре фибробластов куриного эмбриона методом ПЦР в режиме реального времени. Блокирование миграции клеток нервного гребня в склеротоме куриного эмбриона производили введением

в нервную трубку апробированной липофильной siРНК. Для идентификации в склеротоме клеток нервного гребня в нервную трубку с помощью электропорации вводили плазмиду, экспрессирующую GFP. Проанализировано 300 куриных эмбрионов, которые инкубировали 48–50 ч. (время необходимое для локализации клеток нервного гребня в склеротоме). Наблюдение за формированием деформации позвоночника продолжено до окончания роста цыпленка.

Результаты исследования. Определена возможность ингибирования гена *Rax3* в культуре фибробластов куриного эмбриона холестерин-содержащей нуклеазоустойчивой siРНК, способной проникать в клетки без трансфекционного агента. Установлена локализация клеток нервного гребня в склеротоме через 48–50 ч. после инкубации. Эффект ингибирования экспрессии гена *Rax3* в склеротоме куриного эмбриона подтвержден нарушением сегментации позвонков и формирования конечностей на стороне ингибирования.

Выводы. Доказана возможность блокирования экспрессии гена *Rax3* на курином эмбрионе. Предстоит получить деформацию позвоночника, разработать методы доклинической диагностики сколиотической болезни.

Литература:

1. Zaydman A.M., Strokovaya E.L., Kiseleva E.V. et al. A new look at etiological factors of idiopathic scoliosis: neural crest cells. *Int. J. Med. Sci.* 2018; 15(5): 436–46.

СД14

**А.Л. Кайшева, Т.В. Федорончук,
А.Н. Кривенко, К.А. Мальсагова**

БАРЬЕРЫ ДЛЯ РАЗВИТИЯ РЫНКОВ ТОВАРОВ И УСЛУГ В ОБЛАСТИ ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия

**A.L. Kaisheva, T.V. Fedoronchuk, A.N. Krivenko,
K.A. Malsagova**

BARRIERS FOR DEVELOPMENT OF MARKETS OF GOODS AND SERVICES IN THE AREA OF POSTGENOME TECHNOLOGIES

Federal State Budgetary Institution «V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry», Moscow, Russia

kaysheva1@gmail.com

Введение. По итогам 2016 года Россия обладает одним из крупнейших в мире научно-технических комплексов. Так, Россия занимает 6-е место по объему бюджетных затрат на научные исследования, 4-е — по численности занятых в науке [1]. Конкурентные преимущества отечественного научно-технического комплекса заключаются в наличии ведущих научных школ по всем направлениям фундаментальных исследований и результатов мирового уровня в ключевых областях, в том числе в науках о жизни и Земле, физике и химии. Вместе с тем, потенциал развития в области постгеномных технологий, включая редактирование генома, постепенно ослабевает вследствие замкнутости науки. Проявляются системные

проблемы, обусловленные незавершенностью экономических и институциональных преобразований, кризисными явлениями в экономике [2].

Результаты исследования и обсуждение. На развитие рынков терапии онкозаболеваний, превентивной медицины оказывают влияние постгеномные технологии (ПГТ), включая генетическое редактирование. Эти технологии обеспечивают переход к точной медицине, направленной на лечение не болезни, а на предотвращение развития заболевания у конкретного пациента.

ПГТ в значительной степени оказывают влияние на рынки генотерапевтических лекарственных препаратов, «живых лекарств», углеводных вакцин 3-го поколения. Благодаря перенастройке эпигенетического статуса генома станет возможной терапия рака, болезней, связанных со старением, а также наследственных заболеваний. Редактирование генома позволит перейти к глубокой коррекции генотипа человека для существенного продления жизни и повышения ее качества.

ПГТ в части инженерии метагеномов и промышленной биотехнологии позволят путем генно-инженерного воздействия на геном микроорганизмов осуществлять дизайн сообществ микроорганизмов для промышленных целей и получать новые про- и пребиотики. Возможность активного направленного влияния на микробные сообщества позволит увеличить продуктивность животных и биологическую защиту растений, эффективно очищать окружающую среду, интенсифицировать различные биотехнологические процессы, в том числе переработку отходов, получение биотоплива и добычу полезных ископаемых.

В области сельского хозяйства благодаря ПГТ селекции новых и совершенствованию существующих сортов растений, пород животных и аквакультур будут разрабатываться новые сорта растений и породы животных с заданными признаками без внесения чужеродного генетического материала.

На сегодня в области ПГТ различают следующие барьеры: социальные, технологические, экономические, экологические, институциональные, личностные.

Выводы. Выполнен анализ законодательных, социальных и прочих барьеров для развития рынков товаров, услуг и технологий, связанных с реализацией приоритета, определенным пунктом 20в «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» СНТР в области ПГТ. Определен предварительный перечень барьеров для развития рынков товаров, услуг и технологий в области редактирования генома.

Исследование выполнено в рамках Соглашения от 23.10.2017 г. № 14.601.21.0015 с Министерством образования и науки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEF160117X0015). Идентификатор государственного соглашения 0000000007417PE10002.

Литература:

1. Ратай Н. Затраты на науку в России и ведущих странах мира. Информационный бюллетень ИСИЭЗ НИУ ВШЭ «Наука, технологии, инновации» 2017.
2. Прогноз научно-технологического развития Российской Федерации на период до 2030 года в соответствии с требованиями ФЗ от 28 июня 2014 года № 172-ФЗ «О стратегическом планировании в Российской Федерации» (2017).

СД15

B.S. Kalani¹, A. Azarnezhad²,
L. Lotfollahi³, E. Ohadi¹, S. Razavi¹

**ANALYSIS OF THE CRISPR ARRAY
IN *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATED
FROM CLINICAL, FOOD, SEAFOOD AND
ANIMAL SAMPLES IN IRAN**

¹ Department of Microbiology, School of Medicine, Iran
University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Genetics, School of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine,
Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

razavi.sh@iums.ac.ir

CRISPR arrays, which participate to fight against non-self DNA elements, have shown sequence diversity that could be useful in evolution and typing studies. In this study, 55 samples of *L. monocytogenes* isolated from different sources were evaluated for the CRISPR sequence polymorphism. The CRISPR loci were identified by CRISPR databases. A single PCR assay was designed to amplify of target CRISPRs using an appropriate universal primer. Sequencing results were analyzed by CRISPR databases and BLASTn, wherein the CRISPR locus was positive for all the strains. Three hundred repeats including 55 terminal repeats were identified. Four types of consensus DR with different length and sequence were characterized. Sixty repeat variants were observed that carried different polymorphisms. Two hundred and fifty spacers were identified from which 35 consensus sequences were determined, indicating the high polymorphism of the CRISPR spacers. Highest to lowest, identified spacers showed similarities to listeria phage sequences, other bacterial phage sequences, plasmid sequences and bacterial sequences. As the planning of the most effective strategies to control of outbreaks is very vital to fight against bacterial distribution, a robust and precise system of subtyping is required. High levels of polymorphism in CRISPR loci in this study might be related to the origin and time of the samples' isolation. However, it is essential to assess, on a case-by-case basis, the characteristics of any given the CRISPR locus before its use as an epidemiological marker. In conclusion, the results of this study showed that the use of sequence content of CRISPR area could provide new and valuable information on the evolution and typing of the bacterium.

СД16

А.А. Котов, Е.А. Тихонова, Н.А. Золотарев,
П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ
ДОМЕНОВ БЕЛКА CLAMP В ПРОЦЕССЕ
ПРИВЛЕЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ
КОМПЕНСАЦИИ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER НА УЧАСТКИ ХРОМАТИНА**

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук, Москва, Россия

A.A. Kotov, E.A. Tikhonova, N.A. Zolotarev,
P.G. Georgiev, O.G. Maksimenko

**STUDY OF FUNCTIONING OF DOMAINS
OF CLAMP PROTEIN IN RECRUITING
OF DOSAGE COMPENSATION COMPLEX
OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* TO THE
CHROMATIN TARGETS**

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

cotov.sanya2009@yandex.ru

Дозовая компенсация — особый регуляторный механизм, настроенный на выравнивание уровней экспрессии генов, расположенных на половых X-хромосомах, между самками и самцами. Дозовая компенсация у *Drosophila melanogaster* достигается путем увеличения уровней транскрипции генов X-хромосомы самца в два раза по сравнению с аналогичными генами самок. Данный процесс осуществляется за счет специфического связывания комплекса дозовой компенсации (КДК) с X-хромосомой самцов и увеличения уровня экспрессии генов за счет привлечения гистонацетилтрансферазы MOF к промоторам генов. Комплекс дозовой компенсации включает пять белков MSL1, MSL2, MSL3 (male-specific lethal-1, -2, -3), хеликазу MLE (*maleless*), ацетилтрансферазу MOF (*males absent on the first*) и две некодирующие РНК, roX1 и roX2. Согласно общепринятой модели, КДК сначала специфически распознает X-хромосому самца, связывается с ней, а затем посредством ремоделирования хроматина повышает транскрипционную активность генов X-хромосомы в два раза.

Одним из нерешенных вопросов остается механизм, который обеспечивает специфичность связывания КДК только с генами X-хромосомы самцов. Решение этого вопроса имеет принципиальное значение для понимания общих механизмов специфичной посадки белковых комплексов только на определенные последовательности ДНК в составе хроматина *in vivo*. Предполагается, что основную роль в этом процессе играют регуляторные последовательности ДНК, на которые специфично рекрутируется КДК. Такие последовательности обогащены GA-богатыми мотивами и в *in vitro* экспериментах было установлено, что Msl2 и белок CLAMP, содержащий семь доменов «цинковые пальцы» C2H2-типа, способны специфично связываться с такими GA-повторами. Данная работа посвящена изучению принципов совместного функционирования белков CLAMP и Msl2 в процессе специфичной посадки КДК на геномные сайты.

При изучении связи белков Msl2 и CLAMP мы с использованием дрожжевой двугибридной системы и экспериментов *in vitro* установили прямое взаимодействие между ними и идентифицировали участки, необходимые для этого взаимодействия. Для понимания принципов

функционирования белка CLAMP как участника комплекса дозовой компенсации мы разработали модель *in vivo*. Для этого мы получили линии мух с делецией гена *clamp*. С помощью системы CRISPR/Cas9 производилось вырезание кодирующей части гена белка. Делеция маркировалась геном *mCherry* и сайтом рекомбинации *attP*. Отбор трансформантов производился по свечению флуоресцентного белка *mCherry*. Встройка конструкции в нужное место генома подтверждалась ПЦР с использованием специфичных праймеров и секвенированием. Полученные линии в гомозиготном по делеции состоянии доживают до личиночной стадии. С помощью сайт-специфичной рекомбинации по сайту *attP* проводили восстановление гена *clamp*. Для этого были созданы трансгенные конструкции, содержащие кодирующую последовательность гена *clamp* и его модифицированные производные с делециями участков, необходимых для связывания с белками КДК, сайт рекомбинации *attB*, маркерный ген *white*. Параллельно мы разработали модель для управляемой ауксин-индуцируемой деградации белка CLAMP. Для этого кодирующую часть белка CLAMP соединили с ауксин-зависимым деградом. При этом запуск деградации управляется путем скрещивания редактированных таким образом дрозофил с GAL4-драйверами. Такая система позволит изучать функционирование белка CLAMP на разных стадиях развития и в определенных тканях. Полученные трансгенные линии мух, несущие конструкции для экспрессии белка CLAMP и его делеционных производных, будут использованы для изучения принципов привлечения КДК на геномные сайты.

Работа выполняется за счет гранта РФФИ 17-74-20155.

СД17

К.С. Кочергин-Никитский^{1*}, С.А. Болых³,
Р.Д. Векшин³, С.А. Смирнихина¹, А.В. Лавров^{1,2**}

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНА *DES* ДЛЯ НОКАУТА АЛЛЕЛЕЙ, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ДИЛАТАЦИОННУЮ КАРДИОМИОПАТИЮ

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,
Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский национальный
исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Москва,
Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский педагогический
государственный университет», Москва, Россия

K.S. Kochergin-Nikitsky^{1*}, S.A. Bolokh³,
R.D. Vekshin³, S.A. Smirnichina¹, A.V. Lavrov^{1,2**}

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO KNOCKOUT *DES* ALLELES WITH MUTATIONS CAUSING DILATED CARDIOMYOPATHY

¹ FSBI «Research Centre for Medical Genetics»,
Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University
(RNRMU), Moscow, Russia

³ Moscow State Pedagogical University (MSPU),
Moscow, Russia

*KochNik.KS@gmail.com,

**alexandervlavrov@gmail.com

Продукт гена *DES* [2q35], белок цитоскелета десмин, формирует промежуточные филаменты поперечно-полосатой и гладкой мускулатуры, связывая между собой внутриклеточные компоненты миоцитов: z-диски, саркомеры с сарколеммой, митохондриями и др. [1, 2], необходим для поддержания структурной и механической целостности мышц. Отсутствие функционального десмина ведет к мультисистемным нарушениям во всех видах мышечной ткани с нарушением ее структуры и дегенерацией [2]. Такую патологию, как дилатационная миопатия, связывают с миссенс-мутациями в гене *DES* [3, 4]. Заболевание характеризуется дилатацией левого желудочка с нарушением его систолической функции и часто встречается как семейное [5], являясь одной из распространенных форм кардиомиопатии и лидирующей причиной сердечной недостаточности, трансплантаций и смертельных исходов [1, 5]. Тяжесть течения кардиомиопатий, связанных с доминантными gain-of-function мутациями *DES*, можно снизить путем перевода миссенс-мутации в нонсенс, поэтому мы полагаем возможным нокаутить мутантный аллель *DES*, используя систему CRISPR/Cas9 с соответствующими направляющими РНК.

Для проведения исследований был получен генетический материал от трех пациентов с поставленным диагнозом «дилатационная кардиомиопатия» с тремя разными вариантами в гетерозиготном состоянии: *DES* c.330_338del, *DES* p.A337P (c.1009G>C) и *DES* p.R355P (c.1064G>C). Был проведен дизайн направляющих РНК, специфичных мутантным вариантам гена с использованием программного обеспечения Benchling (<http://benchling.com>) с учетом *in silico* подсчитываемых индексов он- и офф-таргетной активности. Таким образом был подобран ряд направляющих РНК: на делецию в экзоне 1 для использования в комплексе с нуклеазой SpCas9 и на два других варианта для использования с ферментом SaCas9. Все направляющие-РНК были клонированы под контролем промотора U6 в плазмидные векторы, содержащие одну из нуклеаз (spCas9(1.1) либо saCas9). Накопление плазмидной ДНК проводилось в клетках *E. coli* (штамм NM522). Полученные плазмиды после выделения и очистки использовались для трансфекции в клетки HEK293T методом кальций-фосфатной трансфекции вместе с плазмидами, содержащими целевые участки гена *DES*. Последние были получены на основе коммерческих векторов pGEM-T (Promega) после вставки в них ПЦР ампликонов, соответствовавших целевым участкам. Выделение ДНК из трансфицированных клеток для дальнейшего анализа проводилось через 48–72 ч. после трансфекции. Анализ наличия коротких инсерций и делеций, характерных для репарации двухцепочечных разрезов, оставляемых нуклеазами Cas9, путем негомологичного соединения концов молекул ДНК (NHEJ), проводили посредством T7E1 анализа и (или) с помощью анализа инсерций/делеций путем декомпозиции (TIDE, <https://www.deskgen.com/landing/tide.html>).

В настоящее время работа по данному проекту продолжается, результаты редактирования гена *DES* с помощью указанных систем Cas9 эндонуклеаза/направляющая РНК будут доложены на конгрессе CRISPR-2018.

Литература:

1. McLendon P.M., Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 301(4): H1220–8.
2. Paulin D., Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp. Cell Res.* 2004; 301(1): 1–7.

3. Maron B.J., Towbin J.A., Thiene G. et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113(14): 1807–16.
4. Li D., Tapscoft T., Gonzalez O. et al. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 100(5): 461–4.
5. Sweet M., Taylor M.R., Mestroni L. Diagnosis, prevalence, and screening of familial dilated cardiomyopathy. *Expert Opin. Orphan Drugs* 2015; 3(8): 869–76.

СД18

Е.В. Кропачева¹, А.В. Олина¹, А.В. Кузьменко¹,
А.А. Аравин², А.В. Кульбачинский¹

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА-АРГОНАВТА ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *KURTHIA MASSILIENSIS*

¹ Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия

² Отделение биологии и биологической инженерии, Калифорнийский технологический университет, Пасадина, США

E.V. Kropacheva¹, A.V. Olina¹, A.V. Kuzmenko¹,
A.A. Aravin², A.V. Kulbachinskiy¹

INVESTIGATION OF THE NUCLEASE ACTIVITY OF THE ARGONAUT PROTEIN FROM THE MESOPHILIC BACTERIUM *KURTHIA MASSILIENSIS*

¹ Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, USA

katerinakropacheva@yandex.ru

Введение. Способность белков Cas бактериальной системы CRISPR осуществлять расщепление ДНК-мишени с помощью гидовой молекулы нуклеиновой кислоты может быть использована для направленных манипуляций с генетической информацией различных организмов. Сходная активность характерна также для некоторых белков из семейства прокариотических аргонавтов. Это позволяет рассматривать их как потенциальный инструмент для направленного редактирования ДНК [1]. До настоящего времени исследованы только несколько аргонавтов термофильных бактерий и архей. Каталитическая активность исследованных аргонавтов зависит от наличия в их составе четырех доменов: N-концевого, MID, PAZ и PIWI и четырех консервативных аминокислотных остатков в каталитическом центре домена PIWI [2]. Мы выбрали удовлетворяющий этим условиям белок из мезофильного штамма бактерий, предполагая, что его активность будет наблюдаться в физиологическом для организма млекопитающих диапазоне температур.

Материал и методы. В своей работе мы использовали бактерии штамма DSM-24639 *Kurthia massiliensis*. Ген белка-аргонаута клонировали в экспрессионный вектор *Escherichia coli*. Очистку

белка производили с использованием металл-аффинной и катионообменной хроматографии. Для определения РНК/ДНК-специфичности аргонаута выделяли ассоциированные с ним нуклеиновые кислоты методом фенол-хлороформной экстракции. Нуклеиновые кислоты радиоактивно метили, обрабатывали специфичными нуклеазами и анализировали с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Наличие каталитической активности проверяли по способности разрезать 102 нт одноцепочечную матрицу при загрузке белка-аргонаута комплементарным 18 нт гидом. Были использованы гиды с четырьмя различными нуклеотидами на 5'-конце в фосфорилированном и нефосфорилированном вариантах. Реакцию проводили при температуре 37 °C в буферных растворах, содержащих ионы Mg²⁺ или Mn²⁺.

Результаты исследования. Согласно полученным данным, при экспрессии белка-аргонаута бактерии *K. massiliensis* в *E. coli* с ним со-выделяются молекулы ДНК длиной около 16–23 и 200 нуклеотидов. Так как нуклеиновые кислоты обнаруживаются преимущественно в нефосфорилированном образце, можно заключить, что они фосфорилированы по 5'-концевому положению. Для исследования каталитической активности *in vitro* была использована оцДНК-мишень и набор из четырех гидовых ДНК. Было показано, что белок-аргонавт *K. massiliensis* способен проявлять нуклеазную активность в данной системе, используя комплементарные гиды с разными 5'-концевыми нуклеотидами. При загрузке аргонаута гидом с концевым гуанином расщепление происходит с наименьшей скоростью. Для выполнения своей каталитической функции белкам-аргонавтам необходимы катионы двухвалентных металлов. Аргонавт из *K. massiliensis* способен катализировать расщепление субстрата в присутствии как ионов марганца, так и магния. Интересно, что несмотря на то, что в клетках *E. coli* аргонавт связывается с фосфорилированными молекулами ДНК в реакции *in vitro*, он способен использовать в качестве гидов ДНК без 5'-концевого фосфата, хотя активность расщепления при этом несколько снижается.

Обсуждение. Аргонавт *K. massiliensis* способен распознавать и с высокой эффективностью расщеплять в определенном месте ДНК-мишень с помощью ДНК-гида, что делает перспективными дальнейшие исследования с целью его применения для направленного редактирования ДНК эукариотических клеток. Способность распознавать нефосфорилированные молекулы гидов ранее была обнаружена у аргонавта *Marinitoga piezophila* и обусловлена особенностями строения кармана связывания 5'-конца гида [3]; предпочтение концевого нуклеотида также зависит от структурных особенностей белка. Механизмы, позволяющие аргонавту *K. massiliensis* успешно использовать гидовые ДНК вне зависимости от наличия фосфата, а также то, на какой стадии — связывания или расщепления проявляются различия в активности при загрузке различными гидами, еще предстоит выяснить.

Выводы. Показано, что белок аргонавт из *K. massiliensis* является ДНК-зависимой ДНК-нуклеазой и способен специфично расщеплять одонитевую ДНК при физиологической температуре. Каталитическая активность этого белка зависит от 5'-концевого нуклеотида, наличия на 5'-конце фосфатной группы, а также типа двухвалентного катиона.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации 14.WO3.31.0007.

Литература:

1. Cubefias-Potts C., Corces V.G. Architectural proteins, transcription, and the three-dimensional organization of the genome. *FEBS Lett.* 2015; 589(20): 2923–30.
2. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V. et al. Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res.* 2015; 25(1): 89–99.
3. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(21): 12285–300.

СД19

Л.К. Курбатов^{1*}, С.П. Радко¹, И.Ю. Торопыгин¹,
В.Г. Згода¹, Н.Д. Дурманов^{2**}

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ
РИБОНУКЛЕАЗЫ CRISPR-CAS13A ДЛЯ
РАЗРАБОТКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ЭКСПРЕСС-
ДИАГНОСТИКИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ
БОРРЕЛИОЗОВ**

¹ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

² ГК по космической деятельности «Роскосмос»,
Москва, Россия

L.K. Kurbatov^{1*}, S.P. Radko¹, I.Yu. Toropygin¹,
V.G. Zgoda¹, N.D. Durmanov^{2**}

**RECEPTION OF THE RECOMBINANT
CRISPR-CAS13A RIBONUCLEASE FOR THE
DEVELOPMENT OF THE EXPRESS DIAGNOSTIC
TEST SYSTEM OF LYME DISEASE**

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² State Space Corporation Roscosmos, Moscow,
Russia

*kurbatovl@mail.ru,

**durmanov@postman.ru

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), или болезнь Лайма, представляет серьезное инфекционное заболевание человека, которое вызывается спирохетами рода *Borrelia* [1]. Через 6–12 месяцев после заражения от клеща болезнь переходит в хроническую стадию, характеризующуюся заболеваниями опорно-двигательного аппарата (артриты, артрозы) и нервной системы (менингиты, менингоэнцефалиты, невриты). Ежегодно количество заболевших ИКБ в РФ увеличивается на 7–10 тыс. человек, в США — на 16 тыс. человек. Серьезный рост заболеваемости боррелиозом в настоящее время также наблюдается во многих странах Европы и Азии.

Быстрое определение наличия боррелий и идентификация их видов и генетических вариантов является необходимым условием эффективного лечения ИКБ, которое возможно на ранней стадии заболевания, а также важно для санитарно-эпидемиологического мониторинга. Использование для этого серологических методов и (или) ПЦР-анализа требует обращения в централизованные специализированные диагностические лаборатории, к тому же использование серологических методов для детекции боррелиоза характеризуется ограниченной чувствительностью и специфичностью.

В 2017 г. вышла работа East-Seletsky A. et al. [2], в которой была показана возможность использования рибонуклеазы Cas13a, представляющей собой один из CRISPR-эффекторов, для детекции нуклеиновых кислот с высокой чувствительностью (≈ 10 пМ)

и специфичностью. Мишенью Cas13a являются молекулы РНК. Узнавание происходит путём спаривания спейсерного участка cr-RNA Cas13a с комплементарным участком РНК-мишени. При связывании происходит активация Cas13a, приводящая к тому, что она начинает неспецифически деградировать все доступные молекулы РНК. Добавление в раствор «молекул-репортёров» — коротких РНК-молекул, несущих на концах флуорофор и «тушитель» (quencher) — позволяет проводить количественную детекцию РНК-мишени, аналогично использованию TaqMan-зондов в ПЦР-анализе. В серии последующих работ [3–5] было показано, что комбинирование Cas13a-детекции с изотермической амплификацией нуклеиновых кислот позволяет создать экспресс-метод для ультрачувствительной (~ 1 аМ) детекции вирусов и бактерий с высокой специфичностью и в формате тест-полоски.

В данной работе в качестве первого необходимого шага в разработке тест-системы для экспресс-диагностики ИКБ в формате тест-полоски мы выполнили экспрессию и очистку рекомбинантного белка Cas13a до степени, позволяющей проводить тестирование его рибонуклеазной активности при связывании Cas13a cr-RNA с РНК-мишенью.

Экспрессионный вектор pET His6-TwinStrep-SUMO-LwCas13a, содержащий ген Cas13a *Leptotrichia wadei*, был трансформирован в штамм RosettaTM 2(DE3)pLysS. Культивирование осуществлялось в среде Terrific Broth (TB) при 37 °C до оптической плотности OD₆₀₀=0,6, после чего добавляли индуктор IPTG до конечной концентрации 500 мкМ. Дальнейший рост культуры проходил при 18 °C в течение 16 ч. Экспрессию Cas13a оценивали визуально после электрофоретического разделения белков *E. coli* ПААГ-электрофорезом и их окраски красителем Кумасси G-250. Очистка рекомбинантного белка осуществлялась на колонках Protino Ni-TED (Macherey-Nagel) по стандартному протоколу в фосфатном буфере. Чистота белка определялась электрофоретическим методом с окраской красителем Кумасси G-250. Относительное количество целевого белка оценивали сопоставлением площадей пиков, соответствующих белковым полосам на геле, после его денситометрии. Идентификация очищенного белка проводилась масс-спектрометрическими методами LC-ESI-MS/MS и MALDI после трипсинолиза вырезанных из акриламидного геля фрагментов.

В ходе работы было установлено, что оптимальным температурным интервалом для экспрессии Cas13a в растворимой форме является диапазон 12–18 °C. Повышение температуры приводит к усилению перехода белкового продукта в нерастворимое состояние. При проведении экспрессии при 37 °C весь рекомбинантный белок находился в тельцах включения. В отличие от Gootenberg et al. [3], очистка Cas13a проводилась с использованием металл-аффинной хроматографии. Рекомбинантный белок сорбировался на колонке за счёт наличия гистидинового тега. Это позволило получать рекомбинантный Cas13a с чистотой от 80 до 90% в разных выделениях с использованием одностадийной очистки. Такой подход представляется оправданным, поскольку по последним сообщениям (электронные публикации) активность данной рибонуклеазы не увеличивается в процессе очистки экстракта и может даже снижаться по сравнению с исходным лизатом. Масс-спектрометрическая идентификация с применением разных методов подтвердила, что экспрессируемый белок действительно представляет собой рибонуклеазу Cas13a.

Проведенная работа по экспрессии и очистке рекомбинантного белка Cas13a создаёт предпосылки для разработки экспресс-диагностики ИКБ в формате тест-полоски. Рекомбинантная рибонуклеаза Cas13a может также быть использована для разработки тест-систем экспресс-диагностики других социально-значимых инфекционных заболеваний.

Литература:

1. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F. et al. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216(4552):1317–9.
2. East-Seletsky A., O'Connell M.R., Burstein D. et al. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes. *Mol. Cell* 2017; 66(3): 373–83.
3. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 2017; 356(6336): 438–42.
4. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J. et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* 2018; 360(6387): 439–44.
5. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S. et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* 2018; 360(6387): 444–8.

СД20

Д.А. Ланшаков^{1*}, Е.В. Шабурова^{1,2},
Н.Н. Дыгало^{1,2**}

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВЕКТОР ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ

¹ Федеральный исследовательский центр
«Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской академии наук»,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

D.A. Lanshakov^{1*}, E.V. Shaburova^{1,2}, N.N. Dygalo^{1,2**}

GENETIC VECTOR FOR TARGETED EXPRESSION OF TRANSGENES IN CATECHOLAMINERGIC NEURONS

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*dmitriylanshakov@gmail.com, lanshakov@bionet.nsc.ru,

**dygalo@bionet.nsc.ru

Введение. Редактирование генома перспективно для решения научных проблем, а также поиска новых методов терапии патологий, обусловленных наследственными причинами. Основной подход, позволяющий редактирование геномов клеток разных типов, основан на технологии CRISPR/Cas9. Для его успешного применения *in vivo* необходима эффективная экспрессия Cas9 в желаемом типе клеток. Нейроны головного мозга, в частности, передающие свой сигнал с участием катехоламинергических нейротрансмиттеров, — потенциально важные и одновременно сложные мишени для генетического редактирования. Активность этих нейронов критична для ряда функций организма, например, регуляции цикла сон/бодрствование,

тревожного поведения, восприятия болевых стимулов, формирования памяти [1]. Сложность этих мишеней обусловлена наличием в мозге нейронов, имеющих сходные по своей природе транскриптеры: дофамин, норадреналин и адреналин, и, следовательно, во многом перекрывающиеся генетические регуляторы их активности. Экспрессия Cas9 в катехоламинергических нейронах необходимого подтипа может быть достигнута доставкой вектора в специфические по своей анатомической локализации дофамин-, норадреналин- или адренергические ядра головного мозга. Однако для этого прежде всего необходимо создать вектор, способный эффективно экспрессировать трансген в нейронах данного типа. В онтогенезе центральной нервной системы транскрипционные факторы *phox2a/2b* определяют развитие катехоламинергических нейронов [2]. Поэтому в работе проверена способность промотора, содержащего многократно повторённые сайты связывания транскрипционных факторов *phox2a/2b*, эффективно и специфично экспрессировать вектор в клетках катехоламинергического фенотипа.

Материал и методы. Промотор, содержащий сайты связывания *phox2a/2b*, повторённые 8 раз, был перенесён из плазмиды pLenti-PRSX8ChR2 (H134R) eYFP (Addgene #8953) в индуцибельный вектор pCW57-MCS (Addgene #80923), экспрессирующий GFP, общепринятыми методами молекулярного клонирования. Для сравнения использовали плазмиду, содержащую GFP под промотором кислого глиального белка GFAP. Клетки линий PC12, C6 и GH3 ($0.2 \cdot 10^7$ в 200 µl IMDM) трансфицировали плазмидами (5 µg ДНК) на электропораторе Bio-Rad Gene-X-Pulser. Экспрессию векторов оценивали по количеству GFP-позитивных клеток на цитометре BD FACSCANTO II (ЦКП ИМКБ СО РАН), а также клеточном имиджере Cell-IQ (ЦКП клеточных технологий ИЦиГ СО РАН). Специфичность вектора для клеток катехоламинергического фенотипа проверялась сопоставлением его экспрессии в линии клеток PC12, экспрессирующей специфичный фермент биосинтеза норадреналина дофамин-β-гидроксилазу, и в линиях клеток C6 и GH3, не экспрессирующих этот фермент.

Результаты исследования. Экспрессия вектора, содержащего в промоторе специфичные для катехоламинергических нейронов сайты связывания транскрипционных факторов *phox2a/2b*, в клетках PC12, имеющих этот нейрохимический фенотип, была в 2 ($p < 0.01$) и в 6 ($p < 0.001$) раз выше, чем в клетках линий GH3 и C6 соответственно, не экспрессирующих фермент синтеза норадреналина. Кроме того, экспрессия в PC12 клетках вектора, транскрипция которого управлялась промотором GFAP, была существенно ($p < 0.001$) ниже по сравнению с экспрессией в этих клетках вектора, управляемого промотором с 8-ю сайтами связывания *phox2a/2b*, специфичными для клеток, имеющих катехоламинергический фенотип.

Обсуждение. В разы более высокая экспрессия вектора, содержащего в промоторе сайты связывания транскрипционных факторов *phox2a/2b*, в клетках катехоламинергического фенотипа по сравнению с клетками иных типов, свидетельствует о способности этого промотора обеспечить клеточную специфичность экспрессии управляемого им трансгена. Такая специфичность достигается за счёт конститутивной экспрессии в клетках PC12 фермента дофамин-β-гидроксилазы и, соответственно, транскрипционных факторов *phox2*, с которыми, очевидно, и взаимодействуют сайты связывания этих факторов, повторённые 8 раз в промоторе вектора.

Более эффективная экспрессия трансгена в клетках PC12 в составе вектора, содержащего сайты связывания факторов *phox2a/2b*, по сравнению с контрольным вектором, не имеющего таких сайтов, также свидетельствует о специфичности созданного промотора для клеток катехоламинергического фенотипа. Обеспечиваемая этим промотором экспрессия вектора в клетках данного фенотипа позволяет доставлять трансгены, в их числе и *Cas9* *in vivo* в дофамин-, норадреналин- или адренергические нейроны путем локального стереотаксического введения векторов в места компактной локализации этих нейронов, соответственно, в среднем мозге, мосту или продолговатом мозге.

Выводы. Промотор, содержащий 8 раз повторенные сайты связывания транскрипционных факторов *phox2a/2b*, может быть использован для индуцибельной экспрессии *Cas9* в катехоламинергических нейронах.

Поддержано грантом РФФИ № 16-34-60103

Литература:

1. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* 2009; 89: 535–606.
2. Coppola E., d'Autréaux F., Rijli F.M., Brunet J.F. Ongoing roles of *Phox2* homeodomain transcription factors during neuronal differentiation. *Development*. 2010; 137: 4211–20.

СД21

Л.С. Литвинова^{1*}, К.А. Юрова¹, В.В. Шуплецова¹,
О.Г. Хазиахматова¹, Е.С. Мелашенко¹,
В.В. Малащенко¹, Е.О. Шунькин¹, Ю.П. Шаркеев³,
Е.Г. Комарова³, М.Б. Седельникова³,
М.И. Галецкий¹, М. Коржанова¹, И.А. Хлусов^{1,2}

ДИСТАНТНОЕ ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ТРЕХМЕРНОГО МАТРИКСА НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ IN VITRO КУЛЬТУРЫ ММСК-ЖТ

¹ Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

³ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

L.S. Litvinova^{1*}, K.A. Yurova¹, V.V. Shupletsova¹,
O.G. Khaziakhmatova¹, E.S. Melashchenko¹,
V.V. Malashchenko¹, E.O. Shunkin¹, Y.P. Sharkeev³,
E.G. Komarova³, M.B. Sedelnikova³, M.I. Galetskiy¹,
M. Korzhanova¹, I.A. Khlusov^{1,2}

DISTANT INFLUENCE OF AN ARTIFICIAL THREE-DIMENSIONAL MATRIX ON THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION IN VITRO OF THE MMSC-AT CULTURE

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Institute of Strength Physics and Materials Science, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

*larisalitvinova@yandex.ru

Введение. Клеточная подвижность, способность к адгезии, созреванию и дифференцировке ММСК

в ответ на внеклеточные сигналы имеет решающее значение для многих клеточных процессов, в том числе при заживлении ран и интеграции имплантатов. Топография и жесткость внеклеточного матрикса регулируют эти процессы путем модификации сигнальных путей, влияющих на организацию цитоскелета [1]. В последние годы большое внимание уделяется поиску оптимальных поверхностей медицинских имплантатов, определяющих их совместимость с биологической средой, зависящих от их химических, физических и электростатических характеристик [2]. С другой стороны, биodeградируемые имплантаты способны опосредованно (без прямого контакта) регулировать жизнедеятельность и поведение ММСК.

Целью настоящего исследования явилось выявление роли имплантатов с рельефным кальцийфосфатным покрытием на титановой подложке, активно применяемых для биоинженерии костной ткани, в остеогенной дифференцировке культуры ММСК-ЖТ в условиях дистантного (непрямого) взаимодействия *in vitro*.

Материал и методы. Состояние 3D-культуры клеток имитировали при помощи добавления в клеточную культуру ММСК, выделенных из липоаспирата человека (Разрешение № 7 от 09.12.2015 ЛЭК БФУ им. И. Канта), подложек (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана с рельефным (индексом шероховатости Ra=2,2–3,0 мкм) кальцийфосфатным (КФ) покрытием, имитирующим модель физиологической регенерации костной ткани. ММСК-ЖТ культивировали с подложками из титана в условиях дистантного взаимодействия *in vitro* в течение 14 суток в стандартной культуральной среде DMEM/F12 при 37 °C, влажности 100%, 5% CO₂. Контролем служили 2D-культуры ММСК-ЖТ на пластике. Исследование уровня относительной экспрессии генов (*BGP*, *ALPL*, *UBC*) осуществляли методом ПЦР. Данные анализировали с использованием программы IBM SPSS Statistics 20.

Результаты исследования. По результатам проведенного исследования было выявлено, что в условиях культивирования *in vitro* наблюдалось индуцирующее действие продуктов растворения (ионов кальция и фосфора, микрокристаллов) рельефной (Ra=2,2–3,0 мкм) КФ поверхности на уровень относительной экспрессии генов остеодифференцировки (*BGP*, *ALPL*). Транскрипция мРНК гена *UBC*, напротив, снижалась.

Обсуждение. Увеличение уровней относительной экспрессии генов *BGP*, *ALPL*, а также выявленные отрицательные взаимосвязи между транскрипцией мРНК *UBC* и *BGP* ($r^2 = -0,624$, $p < 0,05$), *ALPL* ($r^2 = -0,592$, $p < 0,05$) свидетельствуют об эпигеномной активности продуктов растворения КФ покрытия в отношении остеогенной дифференцировки ММСК-ЖТ. Известно, что материалы и покрытия, изготовленные с использованием фосфатов кальция, способствуют эффективной остеодифференцировке [3].

Выводы. Продукты биodeградации рельефной КФ поверхности имплантата, индекс шероховатости которой соответствует модели физиологической регенерации минерального вещества костной ткани (Ra=2,3–3,0 мкм), индуцирует активацию генов, ассоциированных с дифференцировкой ММСК в остеогенном направлении (*BGP*, *ALPL*). Таким образом, возможно дистантно контролировать остеогенную дифференцировку и созревание ММСК на (эпи)геномном уровне, что является одним из механизмов влияния остеозамещающих материалов на репаративную регенерацию костной ткани.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

Литература:

1. Kaivosoja E., Suvanto P., Barreto G. et al. Cell adhesion and osteogenic differentiation on three-dimensional pillar surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2013; 101(3): 842–52.
2. Brammer K.S., Choi C., Frandsen C.J. et al. Comparative cell behavior on carbon-coated TiO₂ nanotube surfaces for osteoblasts vs. osteo-progenitor cells. *Acta Biomater.* 2011; 7(6): 2697–703.
3. McCafferty M.M., Burke G.A., Meenan B.J. Mesenchymal stem cell response to conformal sputter deposited calcium phosphate thin films on nanostructured titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2014; 102(10): 3585–97.

СД22

Л.С. Литвинова¹, К.А. Юрова¹,
В.В. Шуплецова¹, О.Г. Хазиахматова¹,
Е.С. Мелашенко¹, В.В. Мелашенко¹,
Е.О. Шунькин¹, Ю.П. Шаркеев³,
Е.Г. Комарова³, М.Б. Седельникова³,
И.К. Норкин¹, К.И. Прокин¹, И.А. Хлусов^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ШЕРОХОВАТОСТИ ИСКУССТВЕННОГО ТРЕХМЕРНОГО МАТРИКСА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ММСК В УСЛОВИЯХ ДИСТАНТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

¹ Балтийский федеральный университет имени
И. Канта, Калининград, Россия

² Сибирский государственный медицинский
университет, Томск, Россия

³ Институт физики прочности и материаловедения
СО РАН, Томск, Россия

L.S. Litvinova¹*, K.A. Yurova¹,
V.V. Shupletsova¹, O.G. Khaziakhmatova¹,
E.S. Melashchenko¹, V.V. Malashchenko¹,
E.O. Shunkin¹, Y.P. Sharkeev³, E.G. Komarova³,
M.B. Sedelnikova³, I.K. Norkin¹, K.I. Prokin¹,
I.A. Khlusov^{1,2}

INFLUENCE OF THE TOPOGRAPHY OF THE ARTIFICIAL THREE-DIMENSIONAL MATRIX ON THE DIFFERENTIATION OF MMSC IN CONDITIONS OF DISTANT CULTIVATION BY IN VITRO

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad,
Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Institute of Strength Physics and Materials Science,
the Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, Tomsk, Russia

*larisalitvinova@yandex.ru

Введение. Известно, что поверхность имплантата может оказывать модулирующее действие на миграцию, пролиферацию, дифференцировку и созревание ММСК [1]. Биоматериалы с заданными физическими и химическими характеристиками могут направленно влиять на остеогенную дифференцировку ММСК, что позволяет регулировать поведение ММСК в условиях остеointеграции [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение роли шероховатости трехмерного искусственного

матрикса, имитирующего минеральное вещество регенерирующей костной ткани, на остеогенную дифференцировку ММСК в условиях дистантного сокультивирования in vitro.

Материал и методы. В эксперименте in vitro применяли 3D-матрицы (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана, несущие двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие с индексом шероховатости Ra=3,1–4,6 мкм (модель репаративной регенерации кости). ММСК выделяли из липоаспирата человека (Разрешение № 7 от 09.12.2015 ЛЭК БФУ им. И. Канта). Влияние КФ покрытий на экспрессию генов остеодифференцировки оценивали в условиях дистантного взаимодействия клеток с искусственным трехмерным матриксом. Культивирование проводилось в 12-луночных планшетах при 37 °С, влажности 100% в атмосфере 5% CO₂ в течение 14 суток в стандартной культуральной среде DMEM/F12. Контролем служили 2D-культуры ММСК-ЖТ на пластике. Исследование уровня относительной экспрессии генов (*TBP*, *BGP*, *ALPL*) осуществляли методом ПЦР. Данные анализировали с использованием программы IBM SPSS Statistics 20.

Результаты исследования. В результате проведенного исследования при сокультивировании ММСК с трехмерными матриксами было выявлено одностороннее изменение (преимущественно повышение) уровней относительной экспрессии гена транскрипционного фактора *TBP* и генов остеодифференцировки (*BGP*, *ALPL*). Напротив, при сокультивировании ММСК с матриксом, имеющим индекс шероховатости Ra=3,2 мкм, наблюдалось снижение транскрипции мРНК всех изучаемых генов по сравнению с контрольными 2D-культурами. При сокультивировании клеток с трехмерным матриксом, имеющим максимальный индекс шероховатости (Ra=4,6 мкм), уровень относительной экспрессии изучаемых генов не отличался от значений в контрольной 2D-культуре.

Обсуждение. Изменение уровней относительной экспрессии исследуемых генов свидетельствует об эпигеномной активности шероховатости КФ поверхности, которая в условиях непрямого (дистантного) сокультивирования с клетками in vitro может быть обусловлена продуктами ее биodeградации (свободными биологически активными ионами кальция и неорганического фосфора), участвующими в остеодифференцировке ММСК.

Выводы. Шероховатость искусственного трехмерного матрикса с КФ покрытием имеет значение для модулирования активности генов остеодифференцировки (*BGP*, *ALPL*) и транскрипционного фактора (*TBP*) через продукты его биodeградации с потенциальным эпигеномным воздействием на культуру ММСК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

Литература:

1. Silva-Bermudez P., Almaguer-Flores A., Garcia V.I. et al. Enhancing the osteoblastic differentiation through nanoscale surface modifications. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2017; 105(2): 498–509.
2. McCafferty M.M., Burke G.A., Meenan B.J. Mesenchymal stem cell response to conformal sputter deposited calcium phosphate thin films on nanostructured titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2014; 102(10): 3585–97.

СД23

А.М. Матвеева^{1,2}, Ю.А. Филиппова¹,
Е.С. Журавлев¹, Е.А. Балахонова¹,
М.М. Тимофеева¹, Г.А. Степанов^{1,2}

РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9

¹ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины, Сибирское
отделение Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

A.M. Matveeva^{1,2}, J.A. Filippova¹, E.S. Juravlev¹,
E.A. Balakhonova¹, M.M. Timofeeva¹,
G.A. Stepanov^{1,2}

DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING STRATEGY TARGETED AT SNORNAS

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*stepanovga@niboch.nsc.ru

Введение. Геном человека активно транскрибируется, однако белок-кодирующие гены составляют всего ~2 % генома, при этом остальные транскрипты являются некодирующими РНК (нкРНК) [1]. Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) представляют один из наиболее исследованных классов малых нкРНК. С/D-бкс- и Н/АСА-бкс-мяоРНК различают по структурным особенностям консервативных последовательностей и выполняемым функциям: сайт-специфичное 2'-О-метилирование и псевдоуридилирование нуклеотидов пре-рРНК, соответственно [2].

Методы генетической инженерии позволяют вносить изменения в биологические системы и живые организмы и скрывают огромный потенциал в применении как в фундаментальных исследованиях, так и в медицине и биотехнологии. Наиболее популярная на сегодняшний день система CRISPR-Cas II типа была обнаружена как защитный адаптивный механизм иммунного ответа бактерий [3].

Геномное редактирование последовательностей С/D-бкс-мяоРНК, а именно, нокаут на уровне гена, либо точечные изменения в первичной структуре кодирующей последовательности, могут служить эффективным методом в исследовании механизмов действия данного класса РНК.

Материал и методы. В качестве объекта исследования были выбраны U75 и U77 С/D-бкс-мяоРНК, которые осуществляют 2'-О-метилирование C4032 и A1521 нуклеотида 28S рРНК человека, соответственно [4].

Стратегия направленного геномного нокаута включала:

- 1) выбор участка внесения Cas9-индуцированного разрыва в структуре мишеней — U75 и U77 мяоРНК, получение плазмидных конструкций на основе вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP;
- 2) трансфекцию клеток линии 293FT, получение и анализ моноклонов по стандартному протоколу [3];

- 3) подбор праймеров и референсных генов для анализа изменений экспрессии мяоРНК-мишеней методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени;
- 4) разработку методик оценки изменений в уровне 2'-О-метилирования.

Результаты исследования и обсуждение. Основным результатом работы является разработанная стратегия геномного редактирования малых ядрышковых РНК с помощью системы CRISPR/Cas9.

Общая эффективность проведенного редактирования была оценена с помощью обработки секвеннограмм в ПО «TIDE» и составила 34,4% и 45,6% для U75 и U77 мяоРНК соответственно.

Секвенирование по Сэнгеру участка генома для моноклонов, полученных действием конструкции, направленной на редактирование U75 мяоРНК, выявило делецию 10 нт в области узнавания рРНК-мишени 2'-О-метилирования. Для моноклонов, полученных действием конструкции, направленной на редактирование U77 мяоРНК, была выявлена инсерция 1 нт в целевой участок — консервативный С-бкс.

Анализ изменений в экспрессии мяоРНК-мишеней выявил снижение их уровня вплоть до полного исчезновения. Для оценки изменений глубины 2'-О-метилирования был разработан протокол терминации обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени. Показано понижение глубины модификаций для обеих мяоРНК, что свидетельствует о подавлении их активности.

Выбор U75 и U77 мяоРНК в качестве мишеней был обусловлен наличием мотивов РАМ вблизи консервативных последовательностей (D'- и С-бкса, соответственно), что обеспечило снижение уровня экспрессии мяоРНК и ингибирование их активности. При разработке стратегии геномного редактирования следует учитывать, что структура каждой мяоРНК содержит несколько функциональных участков и выбор мишени производится индивидуально в зависимости от положения РАМ.

Выводы.

1. Cas9-индуцированная точечная мутация в С-боксе U77 мяоРНК приводит к снижению ее функциональной активности;
2. Cas9-индуцированная делеция в области узнавания нуклеотида-мишени рРНК для U75 мяоРНК подавляет ее активность в клетках;
3. Разработанная стратегия позволила получить клеточные линии 293FT с мутациями в функциональных областях генов U75 и U77 мяоРНК, которые привели к снижению экспрессии мяоРНК-мишеней и ингибированию их активности.

Разработка методов проведена при поддержке гранта РФФИ 16-34-60136 и грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-6196.2018.4).

Литература:

1. Ezkurdia I., Juan D., Rodriguez J.M. et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. Hum. Mol. Genet. 2014; 23(22): 5866–78.
2. Jorjani H., Kehr S., Jedlinski D.J. et al. An updated human snoRNAome. Nucleic Acids Res. 2016; 44(11): 5068–82.
3. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. 2013; 8(11): 2281–308.

4. Lestrade L., Weber M.J. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: D158–62.

CD24

K.N. Morozova^{1,2}, L.A. Suldina¹,
T.B. Malankhanova¹⁻⁴, E.V. Grigor'eva¹⁻⁴,
S.M. Zakian¹⁻⁴, E. Kiseleva¹, A.A. Malakhova¹⁻⁴

ULTRASTRUCTURAL DEFECTS IN ISOGENIC LINES OF HUMAN CELLS WITH EXPANDED CAG REPEATS IN THE HUNTINGTIN GENE OBTAINED VIA THE CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY

¹ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *E. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia*

⁴ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

morozko@bionet.nsc.ru

Introduction. Huntington's disease (HD) is a severe autosomal dominant disease caused by an increase in the number of CAG (cytosine-adenine-guanine) repeats in the first exon of the huntingtin gene (*HTT*). With a gene content of more than 35 repeats, the synthesized mutant *HTT* protein causes death of brain cells, which leads to impairment of motor and cognitive functions. It has been established that the development of HD is due to disturbance of mitochondrial function, calcium homeostasis and autophagy in cells [1]. Because of the late onset in patients and irrelevant pathogenesis in model animals [2] we studied intracellular mechanisms of the development of this disease on isogenic human cell lines with CAG repeats introduced via CRISPR/Cas9 genome-editing system.

Material and Methods. Using CRISPR/Cas9 technology to modify the *HTT* gene of HEK293Phoenix (human embryonic kidney cell line) we obtained three new isogenic mutant cell lines: 8D with 9 bp deletion in exon 1, 8H with 98 bp deletion and shifted ORF in *HTT* gene, and 6H with 300 and 450 bp insertion. We provided comprehensive study of cellular organelles in these cell lines using electron microscopy and morphometric analysis. The numerical density of autolysosomes, relative number of mitochondria with morphological disturbances (defects of envelope, shape of cristae and matrix density) and the relative density of mitochondria contacting with the endoplasmic reticulum relate of calcium homeostasis were evaluated.

Results. According to our study, when the number of *HTT* repeats in the cells was expanded (cell line 6H), invaginations of the nuclear envelope and disturbances of the mitochondrial structure and mitophagy became more frequent. Increased contacts of mitochondria with membranes of the rough and smooth ER, fusion of mitochondria, and a rise in the number of autolysosomes, vacuolization, and disturbances in the integrity of their membranes were also observed. A knockout (clone 8D), or a shift of the reading frame of the *HTT* gene (clone 8H), did not cause such changes in the morphology of mutant cells.

Discussion. A comprehensive study by electron microscopy and morphometric analysis of three *HTT* mutant cell clones obtained by CRISPR/Cas9 genome editing showed for the first time that an increased number of CAG repeats caused significant disturbances in the

organization of the nuclear envelope and cellular organelles similar to those observed in neurons derived from iPSCs of HD patients [2]. The isogenic cell model of HD is an opportunity to study molecular pathogenesis and to test drugs in the presence of an adequate healthy isogenic control that allows us to exclude the influence of genomic variation. Despite the HEK293 cells having abnormal karyotype we assumed that mutant *HTT* expression should have effect on the cells, and mutant cell clones recapitulate some molecular mechanisms of mHTT action because the HD mutation is known to be dominant [1].

Our results suggest that mutant clones manifested enhanced apoptosis and a decreased proliferation rate as compared to an isogenic control. The increase in the number of mitochondria in contact with ER cisternae in the mutant cells could facilitate the transport of calcium ions to the organelles and disrupt their balance between the organelles and cytosol. An increased number of CAG repeats in the *HTT* gene could initiate disturbances of the later stages of autophagy in mutant 6H cells.

Conclusions. The results obtained suggest that deletion or *HTT* gene knockout does not significantly influence on cell morphology. Insertion of expanded CAG repeats in *HTT* gene causes significant disturbances in cell ultrastructural organization, especially in mitochondrial parameters. Our findings suggest that these mutant HEK293 cells may serve as a model for studying of early defects in ultrastructure of cells with HD modifications.

The work was supported by the Russian Scientific Foundation (project № 16-15-10128).

References:

1. Mattis V.B., Svendsen C.N. Modeling Huntington's disease with patient-derived neurons. *Brain Res.* 2017; 1656: 76–87.
2. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A. et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol. Neurodegener.* 2016; 11: 27.

CD25

Д.С. Новопашина^{1,2}, Е.А. Хабардина²,
М.И. Мещанинова¹, И.П. Вохтанцев²,
А.Г. Веняминова¹, Д.О. Жарков^{1,2}

ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

D.S. Novopashina^{1,2}, E.A. Khabardina²,
M.I. Meschaninova¹, I.P. Vokhtantsev²,
A.G. Venyaminova¹, D.O. Zharkov^{1,2}

PHOTOSENSITIVE GUIDE RNA FOR CONTROLABLE GENE EDITING

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

danov@niboch.nsc.ru

Введение. Последние разработки в области применения технологии редактирования ДНК с помощью

системы CRISPR/Cas9 свидетельствуют об открываемых беспрецедентных возможностях использования этой системы в терапевтических целях, в частности, для создания новых подходов к лечению заболеваний, вызванных увеличением копий определенных генов. К таким заболеваниям относят, например, синдром Шарко-Мари-Тута (наследственная нейродегенеративная патология, причиной которой может служить лишняя копия гена периферического белка миелина PMP22) и синдром Дауна.

Разработка подходов к контролируемому редактированию генов, в частности, к контролируемому уменьшению числа копий мультиплицированных генов с использованием CRISPR/Cas9 системы, является нетривиальным вариантом лечения этих генетических заболеваний.

Одним из способов контроля во времени и пространстве активности олигонуклеотидных конструкций в клетках является использование фотоактивируемых структур в составе олигонуклеотидов [1–3]. Основной идеей данной работы является введение в структуру направляющей РНК (sgРНК или crРНК/tracrРНК), входящей в состав системы CRISPR/Cas9, модификаций, позволяющих в определенный момент инактивировать эту РНК и прекратить действие системы редактирования генома. Такой подход к контролируемому функционированию системы CRISPR/Cas9 предложен впервые. В качестве группировок, позволяющих осуществлять контроль за работой системы, нами использованы фотоактивируемые 1-орто-нитрофенил этиленгликолевые вставки.

Материал и методы. Твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биосет, Россия) с использованием специально синтезированного фотоактивируемого синтона нами получены sgРНК и пара crРНК/tracrРНК. Рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 получена согласно стандартному протоколу [4]. Исследование эффективности расщепления дцДНК проводили с использованием вектора pBluescript II SK(-) со вставкой протоспейсерной последовательности и PAM (5'-TGG-3'). Инактивацию фоточувствительных РНК осуществляли путем УФ-облучения на длине волны 365 нм.

Результаты исследования. Автоматическим фосфитамидным методом в оптимизированных условиях нами были получены sgРНК, crРНК и tracrРНК, а также их аналоги, содержащие одну или несколько фоторасщепляемых вставок в участках, комплементарных модельной ДНК-мишени, и (или) в участках взаимодействия с белком Cas9. Исследована кинетика расщепления фоточувствительных направляющих РНК в растворе при УФ-облучении, подобраны оптимальные условия. В результате сравнительного исследования расщепления плазмидной ДНК системой CRISPR/Cas9 с использованием фоторасщепляемых направляющих РНК в отсутствие и после УФ-облучения продемонстрирована возможность контролируемого выключения этой системы.

Обсуждение. Возможность получения протяженных направляющих РНК, в том числе и sgРНК, путем химического синтеза открывает широкие возможности введения модификаций в состав таких РНК с целью увеличения устойчивости РНК конструкции к действию нуклеаз, усиления ее способности связываться с мембраной клетки и проникать внутрь, а также изменения сродства к ДНК-мишени и (или) или белку Cas9 [5]. Введение фотоактивируемых вставок в ходе автоматического фосфитамидного синтеза по оптимизированному протоколу позволило впервые получить фоторасщепляемые направляющие

РНК, облучение которых приводит к контролируемому выключению системы CRISPR/Cas9 in vitro.

Выводы. В данной работе предложена стратегия контролируемого выключения системы редактирования генома CRISPR/Cas9, основанная на использовании синтетической фоторасщепляемой направляющей РНК. Данная стратегия может стать основой для создания уникального подхода для удаления «лишних» копий гена из генома.

Работа выполнена в рамках базовых проектов ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.1.4, 0309-2016-0004) «Интеллектуальные материалы для биомедицины» и ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.1.5, 0309-2016-0003) «Синтетическая биология: разработка средств манипуляции генетическим материалом и создание перспективных препаратов для терапии и диагностики».

Литература:

1. Nguyen Q.N., Chavli R.V., Marques J.T. et al. Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1758(3): 394–403.
2. Mikat V., Heckel A. Light-dependent RNA interference with nucleobase-caged siRNAs. *RNA* 2007; 13(12): 2341–7.
3. Ankenbruck N., Courtney T., Naro Y., Deiters A. Optochemical control of biological processes in cells and animals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018; 57(11): 2768–98.
4. Anders C., Jinek M. *In vitro* enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* 2014; 546: 1–20.
5. Hendel A., Bak R.O., Clark J.T. et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33(9): 985–9.

СД26

М.А. Орлов, А.А. Рясик, Е.А. Зыкова, А.А. Сорокин ПРОМОТОРЫ БАКТЕРИОФАГОВ ГРУППЫ Т7: ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ДУПЛЕКСА ДНК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СУПЕРСПИРАЛИЗАЦИИ ПРЕДПОЛАГАЕТ РОЛЬ В РЕПЛИКАЦИИ

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

M.A. Orlov, A.A. Ryasik, E.A. Zyкова, A.A. Sorokin T7-LIKE BACTERIOPHAGE PROMOTERS: STRESS-INDUCED DNA DUPLEX DESTABILIZATION SUGGESTS A ROLE IN REPLICATION

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia

orlovmikhaianat@gmail.com

Введение. Регуляция различных процессов, лежащих в основе экспрессии генов и работы системы рестрикции-модификации, происходит за счет взаимодействий ДНК с белками. Такие взаимодействия кодируются не только первичной структурой, но и физико-химическими свойствами макромолекул и могут быть универсальны для различных регуляторных процессов, а также объяснять их взаимосвязь. Так, в случае прокариот транскрипция и трансляция происходят одновременно и согласованно. Кроме того, скорость трансляции способна определять скорость транскрипции. Катализирующая транскрипцию бактериальная РНК-полимераза задействована также в репарации ДНК, контроле геномной стабильности и т.д. [1]. С другой

стороны, узнаваемые ей промоторные области ДНК могут также участвовать в инициации репликации [2].

Материал и методы. Объектом исследования являются бактериофаги группы Т7, содержащие функционально различные промоторы, в том числе с функцией точек начала репликации (ТНР) [1]. Для их геномов получены профили SIDD (Stress-induced Duplex Destabilization, вызванная суперспирализацией дестабилизация дуплекса). Расчет SIDD позволяет количественно оценить влияние топологии на энергетику молекулы ДНК, определяющую вероятность плавления дуплекса для каждой пары нуклеотидов. Известно, что профили SIDD промоторов и ряда других регуляторных областей имеют характерные пики [3].

Результаты исследования. Установлено, что среди 19 фагоспецифичных промоторов ДНК бактериофага Т7 высокую вероятность плавления дуплекса вблизи точки старта транскрипции имеют только те 4, которые служат вторичными ТНР [2]. Рассмотрены промоторы ϕ OL и ϕ OR, расположенные соответственно вблизи 5'- и 3'-концов Т7 и ряда родственных фагов. В случае Т7 они не задействованы в продуктивной транскрипции и функционируют как вторичные ТНР [2]. Установлено, что данные промоторы ассоциированы с областями максимальной дестабилизации дуплекса. Для трех фагов группы Т7 без аннотированных ϕ OL и ϕ OR во фланкирующих областях геномов обнаружены сходные пики SIDD, что предполагает наличие аналогичных промоторов. Рассмотрение профилей SIDD Т7-ДНК при различных параметрах расчета (плотность суперспиральности, ионная сила раствора и температура) показало, что более ранние области «генного каскада» бактериофага (расположенные ближе к 5'-концу) дестабилизируются легче, чем более поздние. При этом для области первичной ТНР генома Т7 установлена дестабилизация, значительно меньшая таковой для промоторов с функцией вторичных ТНР.

Обсуждение. Избирательная дестабилизация нативных промоторов бактериофагов группы Т7 в случае, если они задействованы в репликации ДНК, указывает на возможную роль SIDD как характеристики дуплекса во взаимосвязи этих процессов. Рассмотрение только очень близкой, в ряде случаев идентичной нуклеотидной последовательности данных промоторов (23 пары нуклеотидов) не позволяет объяснить дифференциальное распознавание промоторов разных классов РНК-полимеразой, а также избирательное участие некоторых из них в репликации. Этому может способствовать анализ определяемых широким генетическим контекстом физических свойств ДНК, в частности SIDD. К числу дестабилизированных промоторов относятся ϕ OL и ϕ OR, прилегающие к концевым повторам геномов 7 рассмотренных фагов. Для трех бактериофагов группы Т7 без аннотированных промоторов ϕ OL и ϕ OR обнаружены сходные дестабилизированные области вблизи концов геномов, что предполагает наличие схожих промоторов.

Выводы. Для бактериофагов группы Т7 получены свидетельства того, что SIDD как характеристика дуплекса ДНК может быть существенен не только для инициации транскрипции, но и для начинающейся на промоторах с функцией вторичных ТНР репликации ДНК. В то же время область первичной ТНР генома Т7 слабо дестабилизирована, что может быть связано с различиями в функционировании двух типов областей репликации. Рассмотрение данного параметра дуплекса может быть целесообразно для различных связывающих белки областей ДНК (регуляторных, сайтов рестрикции и т. д.).

Литература:

1. Pani B., Nudler E. Mechanistic insights into transcription coupled DNA repair. *DNA Repair* 2017; 56: 42–50.
2. Dunn J.J., Studier F.W., Gottesman M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 1983; 166: 477–535.
3. Wang H.Q., Benham C.J. Promoter prediction and annotation of microbial genomes based on DNA sequence and structural responses to superhelical stress. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 248–62.

СД27

Е.А. Орлова¹, Д.А. Матвиенко¹, С.В. Кулемзин²,
А.А. Горчаков^{1,2}, К.О. Баранов²,
А.В. Таранин^{1,2}, Л.В. Мечетина^{1,2}

СОЗДАНИЕ НОКАУТИРОВАННЫХ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЫШИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ БЕЛКА FCRLA

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Е.А. Orlova¹, D.A. Matviyenko¹, S.V. Kulemzin²,
A.A. Gorchakov^{1,2}, K.O. Baranov², A.V. Taranin^{1,2},
L.V. Mechetina^{1,2}

FCRLA GENE KNOCKOUT IN MODEL MURINE B CELL LINES TO STUDY THE ROLE OF FCRLA PROTEIN

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

tetraheadral@gmail.com

Введение. Дифференцировка В-лимфоцитов в плазматическую клетку — сложный многоступенчатый процесс, ход которого регулируют множество внутри- и внеклеточных факторов. Одним из таких факторов может являться белок FCRLA, принадлежащий к семейству FCRL. FCRLA, в отличие от других молекул FCRL, не содержит трансмембранных областей и сигнальных мотивов и локализуется внутри клетки в ЭПР [1]. FCRLA специфично экспрессируется В-клетками на многих стадиях их развития и должен играть определённую роль в их биологии. Хотя ранее было показано взаимодействие FCRLA с IgM, IgG и IgA [2, 3], функция его не известна.

Целью данной работы было создание модельных линий мышинных В-лимфоцитов, нокаутированных по гену *Fcrla*, для изучения роли белка FCRLA в биологии В-клеток.

Материал и методы. Для фенотипирования клеточных линий A20 и I.29 использовали цитометрию, для анализа в них экспрессии FCRLA — количественную ПЦР. Нокаутирование гена *Fcrla* проводили с помощью технологии CRISPR/Cas9. Для нуклеофекции использовали одновременно шесть плазмид на основе вектора eSpCas9(1.1), содержащих последовательность одной из шести gPHK, комплементарных участкам первого или второго экзона *Fcrla*, и плазмиду pmaxGFP в качестве котрансформанта. Отбор GFP⁺ клеток проводили с помощью клеточного сортера. Для первичного скрининга клонов на наличие делеций в первом и втором экзонах гена *Fcrla* использовали количественную ПЦР. Наличие делеции подтверждали рутинной ПЦР и секвенированием.

Отсутствие белка FCRLA в клонах-нокаутах проверяли вестерн-блот анализом.

Результаты исследования. В результате фенотипирования В-клеточных линий A2O и I.29 установлено, что линия A2O имеет фенотип IgG⁺/ B220⁺/ CD19⁺/ FCRLA⁺, а линия I.29 — IgM⁺/ B220⁺/ CD19⁺/ CD5⁺/ FCRLA⁺.

В результате нуклеофекции получили 84 клон линии A2O и 85 клонов линии I.29, которые проанализировали на наличие делеции гена *Fcrla*. Для линии A2O обнаружили 2 клон-кандидата на наличие нокаута (4F3 и 5.1D), для линии I.29 — один клон 1E12. Секвенирование показало, что клоны 4F3 и 5.1D содержат делеции размером ~5,2 и ~5,5 т.п.н. соответственно, в результате которых произошло полное удаление первого и частично второго экзона гена *Fcrla*. Вестерн-блот анализ микросомальных фракций и иммунофлуоресцентное окрашивание показали отсутствие экспрессии белка FCRLA в клетках данных клонов.

В случае линии I.29 для клона 1E12 наблюдали разделение ПЦР-продукта участка первого экзона на два бэнда, соответствующих нормальному и укороченному фрагменту. Секвенирование укороченного фрагмента ДНК клона 1E12 показало, что клон имеет делецию размером 615 п.н., затрагивающую первый экзон гена *Fcrla*.

Обсуждение. Нокаутинг *Fcrla* проводили на мышиных линиях A2O и I.29, представляющих собой разные стадии дифференцировки В-лимфоцитов. Линия A2O — это класс-переключённые IgG⁺ В2-клетки, после активации секретируют IgG [4]. Лимфома I.29 — IgM⁺ В-клетки, после активации секретируют IgM, IgA и IgE [5], наиболее изученная модель дифференцировки зрелых наивных В-клеток в плазматические клетки [6]. Обе линии экспрессируют FCRLA на довольно высоком уровне и могут служить моделями для исследования функции FCRLA. Использование для нокаутинга одновременно шести gPHK, по три на первый и второй экзон *Fcrla*, а также добавление в качестве ко-трансфектанта плазмиды с *GFP*, оказалось эффективным методическим подходом, позволившем получить два полных нокаута *Fcrla* линии A2O и один клон-нокаут линии I.29.

Выводы.

1. С помощью технологии CRISPR/Cas9 впервые получены 2 клон — полных нокаута по гену *Fcrla* на модели класс-переключённых В-клеток, линии A2O;

2. На основе линии I.29, модели наивных зрелых В-клеток, получена делеция первого экзона гена *Fcrla*;

3. Полученные нокаутные клоны будут использованы для изучения функциональной роли FCRLA в биологии В-лимфоцитов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00389.

Литература:

1. Kulemzin S., Chikaev N., Volkova O. et al. Characterization of human FCRLA isoforms. *Immunol. Lett.* 2013; 152: 153–8.
2. Wilson T.J., Gilfillan S., Colonna M. Fc receptor-like A associates with intracellular IgG and IgM but is dispensable for antigen-specific immune responses. *J. Immunol.* 2010; 185(5): 2960–7.
3. Santiago T., Kulemzin S.V., Reshetnikova E.S. et al. FCRLA is a resident endoplasmic reticulum protein that associates with intracellular Igs, IgM, IgG and IgA. *Int. Immunol.* 2011; 23(1): 43–53.
4. Kim K.J., Dejoy S.Q. Con A induction of IgG secretion from a B-lymphoid tumour cell line, A2O. *Immunology* 1986; 59(1): 15–21.

5. Alberini C., Biassoni R., Deambrosis S. et al. Differentiation in the murine B cell lymphoma I.29: individual μ^+ clones may be induced by lipopolysaccharide to both IgM secretion and isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17(4): 555–62.
6. Anken E.V., Romijn E.P., Maggioni C. et al. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* 2003; 18(2): 243–53.

СД28

И.С. Осадчий, Н.А. Золотарев,
О.Г. Максименко, П.Г. Георгиев

ИЗУЧЕНИЕ СБОРКИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОМПЛЕКСА НА ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук, Москва, Россия

I.S. Osadchiy, N.A. Zolotarev, O.G. Maksimenko,
P.G. Georgiev

STUDYING OF TRANSCRIPTION COMPLEX ASSEMBLY AT THE PROMOTERS OF RIBOSOMAL PROTEIN GENES

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

untie@mail.ru

Введение. Сборка транскрипционного комплекса на промоторе — один из основных этапов регуляции транскрипции. Несмотря на множество работ по этой теме, некоторые вопросы остаются открытыми [1]. У дрожжей за инициацию транскрипции генов «домашнего хозяйства» и тканеспецифичных генов отвечают два разных транскрипционных комплекса. В процессе транскрипции генов «домашнего хозяйства» важную роль играет привлечение на промотор белков TRF2 и CP190 [2, 3].

Ранее мы описали белок Orbp, который регулирует транскрипцию генов рибосомальных белков, промотор которых располагается вблизи промотора тканеспецифичного гена [4]. С помощью CRISPR/Cas9 нами была получена линия мух с делецией гена *orbp*, в которой можно было заменять последовательность гена различными производными. В данной работе мы использовали преимущества CRISPR/Cas9 для изучения белка Orbp и промоторов, которые он регулирует.

Материал и методы. Методы дрожжевой двугибридной системы и получения делеции с помощью CRISPR/Cas9 описаны в статье [4].

Результаты исследования. Мы удалили ген *orbp*, внеся разрывы в первом интроне и в 3'-концевой области гена. С помощью гомологичной рекомбинации на место гена была встроена конструкция с маркерным геном *mCherry* и сайт attP для фC31-зависимой рекомбинации. Это позволило нам встраивать конструкции с различными производными гена *orbp* на место делеции.

Мы восстановили последовательность гена *orbp*, добавив на C-конец белка 3xHA-эпитоп. Для удаления маркерных генов мы использовали Cre/lox-рекомбинацию. При этом в первом интроне гена *orbp* оставался lox-сайт, но он не влиял на эффективность сплайсинга и экспрессию белка.

После восстановления гена мы обнаружили, что полученная линия мух несет неспецифические

(off-target) мутации, влияющие на жизнеспособность мух. Мы провели рекомбинацию с линией мух, несущих маркерный ген *yellow* вблизи гена *opbp*. В результате рекомбинации нам удалось получить гомозиготную линию мух с восстановленным геном *opbp*, что означало отсутствие в линии летальных неспецифических мутаций.

С помощью дрожжевой двугибридной системы мы обнаружили участки взаимодействия белка Opbp с белками TRF2 и CP190. Во взаимодействии участвуют N- (64–105 а.о.) и C-концевые последовательности (544–562 а.о.). Мы получили производные гена *opbp* с делецией этих участков и встроили их на место исходного гена. Правильность встраивания конструкций была проверена с помощью ПЦР. При восстановлении геном *opbp* с делециями нам удалось получить гомозиготные линии, что говорит о функциональности полученных производных.

Обсуждение и выводы. Используя полученные линии, мы планируем проанализировать влияние делеций в белке Opbp на уровень транскрипции генов рибосомальных белков. Кроме того, с помощью иммунопреципитации хроматина мы проверим сборку транскрипционного комплекса и привлечение белков TRF2 и CP190 на промотор.

С помощью CRISPR/Cas9 нам удалось создать модельную систему для изучения активности промоторов при изменении транскрипционного фактора.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01531.

Литература:

1. Zabidi M.A., Arnold C.D., Schernhuber K. et al. Enhancer—core-promoter specificity separates developmental and house-keeping gene regulation. *Nature* 2014; 518: 556–9.
2. Hochheimer A., Zhou S., Zheng S. et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* 1998; 393: 245–9.
3. Wang Y.L., Duttke S.H., Chen K. et al. TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev.* 2014; 28: 1550–5.
4. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 12285–300.

СД29

**С.В. Павлова^{1–3}, С.П. Медведев^{1–3},
Е.В. Дементьева^{1–3}, Е.В. Чепелева²,
Е.Д. Сорокоумов⁴, С.М. Закиян^{1–3}**

МОДУЛЯЦИЯ КАРДИАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ CAS9-SAM АКТИВАЦИИ ГЕНА *SHOX2*, ОТВЕЧАЮЩЕГО ЗА ПЕЙСМЕЙКЕРНЫЙ ПУТЬ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

² ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина»
Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

⁴ Институт вычислительных технологий СО РАН,
Новосибирск, Россия

**S.V. Pavlova^{1–3}, S.P. Medvedev^{1–3},
E.V. Dementyeva^{1–3}, E.V. Chepeleva²,
E.D. Sorokoumov⁴, S.M. Zakian^{1–3}**

CARDIAC DIFFERENTIATION MODULATION BY CAS9-SAM ACTIVATION OF *SHOX2*, A KEY GENE IN PACEMAKER DEVELOPMENT

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS,
Novosibirsk, Russia

² Meshalkin National Medical Research Center,
Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk,
Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Computational Technologies SB RAS,
Novosibirsk, Russia

sonpavlova@gmail.com

Введение. Создание биологического пейсмекера является одной из актуальных проблем регенеративной медицины. Наиболее перспективными являются подходы получения пейсмекерных кардиомиоцитов с помощью кардиальной дифференцировки плюрипотентных клеток. В результате применения современных протоколов дифференцировки получают преимущественно сократительные кардиомиоциты, тогда как доля пейсмекеров ничтожно мала [1]. Известно, что транскрипционные факторы *SHOX2* и *NKX2.5* являются антагонистами и запускают генетическую программу развития пейсмекерных и сократительных кардиомиоцитов соответственно [2]. Для того чтобы сместить кардиальную дифференцировку в сторону получения пейсмекеров, мы предлагаем использовать систему CRISPR/Cas9-Synergistic Activation Mediator (SAM) для активации гена *SHOX2* на ранних этапах кардиальной дифференцировки.

Материал и методы. Для внесения компонентов системы Cas9-SAM в линию ИПСК iMA1L проводили трансдукцию лентивирусами, несущими плазмиды *lentiCAS-VP64_blast* (Addgene 61425) и *lentiMS2-P65-HSF1_Hygro* (Addgene 61426) с последующей селекцией клеток на устойчивость к Blasticidin и Hygromycin В. Полученные субклоны iMA1L были проверены на способность дифференцироваться в кардиомиоциты. Кардиальную дифференцировку проводили согласно протоколу, основанному на получении мезодермальных предшественников путем активации сигнального пути WNT с помощью CHIR99021 в течение 48 ч. и последующем его ингибировании IWP2 [1].

Выбор последовательности спейсера в промоторной области гена *SHOX2* (NM_001163678.1) -53 (5'-GGAGAAAAAGAAGTAAGAAG-3') и -144 (5'-AAGGGGCGGGGCTGCCGGA-3') проводили с использованием benchling.com. Олигонуклеотиды, несущие последовательность спейсера, клонировали в плазмиду sgRNA(MS2) (Addgene 61424) согласно протоколу (<http://sam.genome-engineering.org>). Для оценки эффективности работы системы Cas9-SAM была получена репортерная конструкция, несущая промоторную область гена *SHOX2* (-425;+100) перед геном TagRFP (Евроген). Плазмиды с sgRNA и репортерной конструкцией вносили в субклоны iMA1L-SAM12 и iMA1L-SAM18 с помощью реагента TransIT®-LT1 (Mirus) по протоколу (www.mirusbio.com) за 48 ч. до начала кардиальной дифференцировки или на стадии формирования мезодермальных предшественников. Оценку доли пейсмекеров в популяции дифференцированных клеток проводили методом FACS. Электрофизиологическую характеристику кардиомиоцитов проводили методом Patch-clamp.

Результаты исследования и обсуждение. Успешное проведение кардиальной дифференцировки оказалось возможным через 48 ч. после доставки sgRNA(-53) и (-144), специфичных для промоторной области гена *SHOX2*, в клетки линий iMA1L-SAM12 и iMA1L-SAM18 или при трансфекции на стадии мезодермальных предшественников через 48 ч. после добавления CHIR99021. Эффективность трансфекции оценивалась с помощью плазмиды pmax-EGFP (Lonza) и составляла 50% для ИПСК и 70% для мезодермальных предшественников кардиомиоцитов. После котрансфекции sgRNA и репортерной плазмиды через 48 ч. наблюдали свечение TagRFP в 20% iMA1L-SAM и 40% их мезодермальных дериватов, что свидетельствовало об активации Cas9-SAM системой промотора гена *SHOX2*. Результаты кардиальной дифференцировки в присутствии компонентов Cas9-SAM оценивали методом FACS на 20 день дифференцировки и показали, что увеличение доли пейсмейкерных кардиомиоцитов происходило при трансфекции sgRNA только на стадии мезодермальных предшественников.

Выводы. Разработан подход для увеличения доли пейсмейкерных кардиомиоцитов человека в результате активации ключевого гена *SHOX2* с помощью системы Cas9-SAM в процессе кардиальной дифференцировки ИПСК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10322.

Литература:

1. Burrridge P.W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 2014; 11(8): 855–60.
2. Ye W., Wang J., Song Y. et al. A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaking cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Dev.* 2015; 142: 2521–32.

СДЗО

Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, А.Ю. Гаврилова КОНТРОЛЬ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», Орёл, Россия

N.E. Pavlovskaya, I.Yu. Solokhina, A.Yu. Gavrilova BIOSAFETY CONTROL OF TRANSGENIC PLANTS

FGBOU VO «Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina», Orel, Russia

Solohinalrina@yandex.ru

Введение. Новые сорта сельскохозяйственных растений, разработанные с помощью современных биотехнологий, определены как генетически модифицированные. В настоящее время генная инженерия растений использует только несколько генов, таких как *Bt* гены токсина для устойчивости к насекомым и гены устойчивости к гербицидам для борьбы с сорняками [1]. Развитие следующих факторов позволит разработать новое поколение генетически модифицированных культур с несколькими трансгенами. Это достигается с помощью геномного редактирования.

Геномное редактирование — это, по сути, форма мутагенеза. И если старые методики опираются на случайные события, геномное редактирование точное

и целенаправленное действие, что приводит к резкому снижению временных затрат и созданию сортов с заданными свойствами. Геномное редактирование, также как и создание генномодифицированных растений, требует контроля пищевой и кормовой безопасности. Политический процесс в Европе ограничил широкое проникновение генномодифицированных культур в коммерческом использовании [2–5].

Целью нашей работы является исследование изменения метаболизма трансформированных растений сои и контроля безопасности на лабораторных мышах.

Материал и методы. Количественное содержание белка определяли по Кьельдалю. Активность ингибиторов протеиназ определяли казеинолитическим методом М.Л. Какейда в модификации И.И. Бенкен. Определение генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги, в пищевых продуктах осуществляли методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией. Методические указания (Минюст РФ 06.02.2008 № 11117). Биохимические показатели крови определяли на фотометре «Multiskan EX» с использованием наборов реагентов от производителя фирмы «Thermo Electron Corp.» в сыворотке (или плазме) крови без следов гемолиза.

Результаты исследования. Исследована метаболика сортов сои на содержание белков, ингибиторов протеиназ и лектинов. Связь между содержанием общего белка в семенах генномодифицированных сортов сои и негенномодифицированными не установлена. Трипсинингибирующая активность семян во всех образцах сои ниже, примерно в 2 раза, по сравнению с химотрипсинингибирующей активностью. Высокая активность лектинов, выявленная в генномодифицированных семенах сои, дает основание использовать этот показатель как маркер генных модификаций и контролировать пищевую безопасность. Исследование биобезопасности трансгенной сои проводили на белых лабораторных мышах одной аутбредной СД-1 линии обоих полов в условиях вивария. При применении сои в рационах белых лабораторных мышей отмечены незначительные изменения в функциональной работе печени опытных животных. Биохимические показатели крови были наиболее близкими между всеми опытными группами животных.

Обсуждение. В генетически модифицированной сое отсутствуют статистически достоверные различия по содержанию белка. Установлено, что содержание протеина в образцах сои зависит от сорта семян и не зависит от принадлежности к генно-инженерной трансформации. Нашими исследованиями установлено, что если активность трипсина в генномодифицированных образцах сои примерно в 1,5 раза ниже, чем в образцах негенномодифицированных, то активность химотрипсина, напротив, у геннотрансформированных семян сои в 2 раза выше, чем у негенномодифицированных образцов. Регистрация различий в активности ингибиторов у трансгенных и обычных сортов важна тем, что помогает установить безопасность сельскохозяйственной продукции, полученной из подобного сырья, которое может оказаться токсичным и аллергенным для животных и человека. Применение сои в рационе мышей не выявило токсического воздействия на организм животного.

Выводы. Проведенные исследования метаболизма генномодифицированной сои показали неоднозначные результаты: количество общего протеина в семенах не зависят от генных трансформаций. Активность ингибиторов трипсина и лектинов, напротив, прямо коррелируют с генными трансформациями, что вполне логично, исходя из признака устойчивости ГМО к биогенным факторам.

Для анализа биобезопасности продукции с трансгенной соей проведена токсикологическая оценка на основе биохимических показателей крови лабораторных мышей.

Литература:

1. Yu W., Yau Y.Y., Birchler J.A. Plant artificial chromosome technology and its potential application in genetic engineering. *Plant Biotechnol. J.* 2016; 14(5): 1175–82.
2. Smyth S.J., Phillips P.W. Risk, regulation and biotechnology: the case of GM crops. *GM Crops Food* 2014; 5: 170–7.
3. Proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council amending Regulation (EC), No 1829/2003 as regards the possibility for the Member States to restrict or prohibit the use of genetically modified food and feed on their territory, Brussels, European Commission (2015).
4. Regulation of the European parliament and of the council Amending directive 2001/18/EC as regards the possibility for the member states to Restrict or prohibit the cultivation of GMOs in their territory, Brussels, 13.7.2010 COM, 375 final (2010).
5. Wolt J.D., Wang K., Yang B. The regulatory status of genome edited crops. *Plant Biotechnol. J.* 2016; 14(2): 510–8.

СДЗ1

Н.П. Перетолчина^{1,2}, Ю.П. Джигоев^{1,3},
Л.А. Степаненко¹, В.Т. Климов², А.Ю. Борисенко¹,
Е.А. Воскресенская⁴, В.И. Злобин¹

АНАЛИЗ CRISPR-ЛОКУСОВ ШТАММОВ *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

¹ ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск, Россия

² ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

³ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

⁴ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

N.P. Peretolchina^{1,2}, Y.P. Dzhigoev^{1,3},
L.A. Stepanenko¹, V.T. Klimov², A.Y. Borisenko¹,
E.A. Voskresenskaya⁴, V.I. Zlobin¹

ANALYSIS OF CRISPR-LOCI OF *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATING IN SIBERIA AND FAR EAST OF RUSSIA

¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

² Irkutsk Scientific Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russia

³ Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk, Russia

⁴ Saint-Petersburg Scientific Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

nadine1lenz@gmail.com

Введение. Представители рода *Yersinia* часто используются исследователями как модель для изучения эволюционных процессов и разнообразия

микроорганизмов в экосистемах благодаря выраженной гетерогенности видов иерсиний по признаку патогенности. Род *Yersinia* включает высокопатогенный вид *Y. pestis*, эволюционировавший из патогенного вида *Y. pseudotuberculosis*, патогенные варианты *Y. enterocolitica*, происходящие от непатогенного предшественника, и 15 других видов, рассматриваемых в настоящее время как непатогенные [1, 2].

В последние годы в научной среде возрос интерес к изучению CRISPR-системы в связи с различным применением её как в медицинской, так и в научной практике. Так, например, эффекты Cas-генов могут быть использованы для редактирования генов, а изучение структуры CRISPR-локусов дают информацию об эволюции и разнообразии штаммов бактерий на определенной территории или в экосистеме [3].

Целью настоящего исследования явилось определение разнообразия спейсерных последовательностей штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на территориях Сибири и Дальнего Востока.

Материал и методы. В ходе исследования изучено 98 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от больных людей, животных и птиц. Так как известно, что в геноме *Y. pseudotuberculosis* находятся 1–3 локуса CRISPR-системы, нами подобраны специфичные праймеры к локусам YP1, YP2 и YP3 с применением онлайн-инструмента Primer-BLAST [4, 5]. Фрагменты локусов выделены с использованием стандартной ПЦР с последующим секвенированием амплифицированных фрагментов. Для фрагментов длиной более 1000 п.н. подобраны внутренние праймеры.

Результаты исследования. Все изученные *Y. pseudotuberculosis* имеют CRISPR-систему типа IF. В ходе исследования выявлено пять групп штаммов с различным количеством CRISPR-локусов: (1) 12 штаммов, имеющие все три CRISPR-локуса (YP1, YP2 и YP3); (2) 5 штаммов с двумя локусами YP1 и YP2; (3) большинство штаммов (n=78) характеризовалось двумя локусами YP1 и YP3; (4) один штамм только с локусом YP1; (5) 2 штамма только с локусом YP2. Внутри групп штаммы также были разделены на подгруппы в соответствии с длиной локусов и спейсерным составом. В результате анализа полученных данных обнаружено, что в группах 1, 2 и 5 представлены штаммы, циркулирующие как в Сибири, так и на Дальнем Востоке. В многочисленную третью группу вошли, преимущественно, штаммы, циркулирующие на территории Сибири. Кроме того, в этой группе, в зависимости от длины локуса YP3 выделено две подгруппы: 2000 п.н. и 800 п.н. Локусы второй подгруппы состоят из 9 спейсеров, которые также находятся на концах локусов YP3 штаммов подгруппы 1. Следует заметить, что ни в одной группе или подгруппе нет четкого территориального разделения штаммов по спейсерному составу локусов.

Выводы. На территориях Сибири и Дальнего Востока циркулируют штаммы *Y. pseudotuberculosis* с различным спейсерным составом. Наиболее вариабелен CRISPR-локус YP3, что свидетельствует о функционировании CRISPR/Cas-системы в отношении данного локуса. Локус YP1 достаточно консервативен у штаммов в пределах данного региона. Возможно, что штамм в процессе эволюции приобрел шаблон CRISPR/Cas-системы и затем достраивал локус YP3 в ходе встреч с МГЭ. Полученные результаты и дальнейшие исследования помогут установить механизм приобретения и работы CRISPR-системы иерсиний. Показана также возможность использования CRISPR-типирования для мониторинга штаммов *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих на отдельных территориях.

Литература:

1. Сомова Л.М. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка: формирование представлений о патоморфогенезе «новой» болезни. Здоровье. Медицинская экология. Наука 2017; 3(70): 12–6.
2. Reuter S., Connor T.R., Barquist L. et al. Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014; 111(18): 6768–73.
3. Luo M.L., Leenay R.T., Beisel C.L. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria. Biotechnol. Bioeng. 2016; 113(5): 930–43.
4. Перетолчина Н.П., Джигоев Ю.П., Борисенко А.Ю. и др. Биоинформационный анализ CRISPR/Cas системы штамма *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук 2016; 1(5): 64–7.
5. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 2012; 13: 134.

CD32

Н.В. Пермякова, Ю.В. Сидорчук, Т.В. Маренкова,
С.А. Хозеева, А.А. Загорская, Е.В. Дейнеко

ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА *GFP* ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 В КУЛЬТУРЕ СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОК *ARABIDOPSIS THALIANA*

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

N.V. Permyakova, Y.V. Sidorchuk, T.V. Marenkova,
S.A. Khozeeva, A.A. Zagorskaya, E.V. Deineko

INACTIVATION OF THE *GFP* GENE BY CRISPR/CAS9 IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SUSPENSION CELL CULTURE

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

puh@bionet.nsc.ru

Введение. Синтез рекомбинантных белков в суспензионных культурах генетически модифицированных растительных клеток является перспективной и быстро развивающейся областью биотехнологии растений. Система сайт-специфического редактирования генов CRISPR/Cas9 может стать эффективным инструментом для решения ряда проблем, существующих в данной системе экспрессии, тем не менее примеров ее применения для редактирования генома растительных клеток растущих в суспензионных культурах крайне мало [1–4]. В данной работе мы показали эффективность использования системы CRISPR/Cas9 для инактивации репортерного гена *gfp*, интегрированного в геном быстрорастущей суспензионной культуры клеток *A. thaliana*.

Материал и методы. Исходным материалом послужила суспензионная культура растительных клеток *A. thaliana*, предоставленных Носовым А.В. (ИФР РАН, г. Москва). На основе этой культуры в нашей лаборатории была получена культура трансгенных клеток, несущих репортерный ген *gfp*.

Плазмиды pBlu/gRNA (Addgene plasmid # 59188) и Cas9 MDC123 (Addgene plasmid # 59184) были получены в дар от Роберта Ступара [5] из репозитория Addgene.

сгРНК, специфичная для участка гена *gfp*, сформированная из Fph_gRNA-GFP GATTGTGGTCAACGAGGGTGGGCCA и Rph_gRNA-GFP AAACCTGGCCCCACCTCTGTGACCAC, была вставлена в последовательность, кодирующую направляющую РНК, которая затем была перенесена в плазмиду Cas9 MDC123, несущую ген эндонуклеазы Cas9.

Для получения сайт-специфических мутаций использовали агробактериальную трансформацию.

Для выявления сайт-специфических мутаций в гене *gfp* было проанализировано 65 образцов ДНК, выделенных из полученных после трансформации индивидуальных клеточных линий.

Для выявления мутаций использовался рестрикционный анализ ПЦР-фрагментов целевого гена (праймеры Up_gfp TTGTGCCCCAGGATGTTGCC и lo_gfp GGTGAGCAAGGGCGAGGAGC), рестриктазой *AspS9I*, сайт рестрикции которой расположен в месте предполагаемой сайт-специфической мутации. Те образцы, в которых ДНК не гидролизовалась и предположительно несли мутацию, были отправлены на секвенирование.

Каллусные линии, предположительно несущие мутацию в гене *gfp*, были проанализированы по уровню накопления GFP-белка по стандартной методике.

Результаты исследования. Среди проанализированных 65 каллусных линий было выявлено 16 (24,6%), в которых ПЦР фрагмент гена *gfp* полностью или частично не подвергался рестрикции *AspS9I*. В одной из линий при секвенировании была выявлена однонуклеотидная замена в сайте мутации. В остальных линиях ДНК оказалась негомогенной, что обусловлено гетерогенностью клеточной культуры. При анализе белка GFP у мутантных линий было выявлено существенное снижение его уровня или полное его отсутствие по сравнению с исходной линией.

Обсуждение. В данной работе мы показали, что система CRISPR/Cas9 может быть успешно использована для модификации генома *A. thaliana* в суспензионной культуре клеток. Частота мутаций репортерного гена *gfp* составила 24,6%. Большинство мутаций приводило к снижению наработки белка. Анализ индивидуальных мутаций затруднен гетерогенностью клеточных культур, что может быть связано с нестабильностью работы CRISPR/Cas9, замолканием генов или неполным переносом Т-ДНК, а также с тем, что CRISPR/Cas9 модифицирует целевой ген позже, чем клетки успевают пройти деление. Данная проблема была выявлена и в работах с клетками BY-2 *Nicotiana tabacum* [2]. Для получения индивидуальных мутантных линий, несущих одну необходимую мутацию, необходимо проводить плэйтинг. Это особенно актуально для получения сайт-специфических мутаций в хозяйских генах полиплоидных видов, таких как табак или пшеница. Так, для полного исключения при помощи CRISPR/Cas9 двух генов, отвечающих за присоединение к белку собственных растениям N-гликанов в клетках BY-2, необходимо было получить биаллельные мутации в семи генах [1].

Выводы. Таким образом, показано, что система CRISPR/Cas9 может эффективно использоваться для внесения сайт-специфических мутаций в геном *A. thaliana* в суспензионной культуре клеток, однако получение линий, гомогенных по мутациям, требует дополнительных усилий.

Работа была поддержана проектом РФФИ: 17-14-01099.

Литература:

1. Hanania U., Ariel T., Tekoah Y. et al. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnol. J.* 2017; 15: 1120–9.
2. Mercx S., Tollet J., Magy B. et al. Gene inactivation by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension cells. *Front. Plant Sci.* 2016; 7: 40.
3. Mercx S., Smargiasso N., Chaumont F. et al. Inactivation of the β (1,2)-xylosyltransferase and the α (1,3)-fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 1–11.
4. Ren C., Liu X., Zhang Z. et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Rep.* 2016. 6: 32289.
5. Michno J.M., Wang X., Liu J. et al. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops Food* 2015; 6(4): 243–52.

СД33

В.С. Скрипова¹, И.А. Асцатуров^{1,2}, Р.Г. Киямова¹
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТочНОЙ
ЛИНИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ К ПЛАТИНОВЫМ ПРЕПАРАТАМ,
С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9

¹ Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, США

V.S. Skripova¹, I.A. Astsaturov^{1,2}, R.G. Kiyamova¹
IDENTIFICATION OF GENES REGULATING
PLATINUM SENSITIVITY OF PANCREATIC
CANCER CELL LINE USING CRISPR/
CAS9 TECHNIQUE

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

vera.skripova@hotmail.com

Введение. Рак поджелудочной железы (РПЖ) — один из самых агрессивных типов опухолевых заболеваний со средней 5-летней выживаемостью 7%, что обусловлено, в том числе, устойчивостью опухолей к химиотерапевтическим препаратам, включая производные платины [1]. Внутриклеточные механизмы, которые отвечают за развитие подобной резистентности в опухолях поджелудочной железы, до конца не выявлены. Мы применили технологию CRISPR/Cas9 в формате высокопроизводительного скрининга с использованием библиотек генов РНК (гРНК) для поиска генов, продукты которых могут быть вовлечены в регуляцию чувствительности опухолевых клеток поджелудочной железы к платиновым препаратам.

Материал и методы. В работе были использованы две лентивирусные библиотеки гРНК: 1) к генам ядерных белков и белков регуляции клеточного цикла (КЦ, 4 716 генов-мишеней, ~50 тыс. гРНК), 2) полногеномная библиотека (ПГ, 18 164 гена-мишеней, 90 тыс. гРНК).

Клетки MIAPaCa-2/Cas9, трансдуцированные библиотечными гРНК, культивировали в присутствии 1 мкг/мл доксициклина для индукции экспрессии Cas9, затем обрабатывали 1 μ M оксалиплатином или 3 μ M цисплатином в течение 9 клеточных делений (12 суток). В качестве

контроля использовали клетки, не обработанные лекарством. Из образцов выделяли геномную ДНК для подготовки проб и проведения NGS секвенирования с целью получения информации об изменении распределения количества гРНК, как описано ранее [2].

Статистическая обработка данных проводилась, как описано ранее [3]. В качестве хитов выбирали гены, количество гРНК (минимум двух) к которым достоверно ($FDR < 0,05$) изменялось в образцах, обработанных лекарством, по сравнению с контролем.

Результаты исследования. В результате работы было выявлено 755 генов, распределение гРНК к которым достоверно отличалось при добавлении доксициклина и лекарства по сравнению с контролем.

При отборе генов-кандидатов был введен дополнительный критерий, а именно: представленность минимум 2х гРНК на каждый ген должна изменяться в 2.1 раза и больше. В результате было отобрано 130 генов-кандидатов, из которых 16 генов, которые кодируют известные маркеры чувствительности к платине, 11 генов, нокаут которых уменьшал чувствительность, и 119 генов, нокаут которых повышал чувствительность к препаратам. Анализ распределения отобранных генов по функциям показал, что эти гены участвуют в регуляции клеточного цикла [46], репликации и репарации ДНК [43], клеточных дефектах [15], структурной организации клетки [35] и организации морфологии клетки [48]. Анализ сети взаимодействий продуктов отобранных генов показал, что 74 взаимодействуют между собой и участвуют в процессах регуляции клеточного цикла и репарации ДНК.

Обсуждение. Проведенный первичный скрининг позволил выявить 130 генов, которые потенциально участвуют в регуляции чувствительности клеток MIAPaCa-2 к цисплатину и оксалиплатину. Анализ отобранных генов показал, что большая часть отвечает за регуляцию клеточного цикла и репарацию ДНК, а также образует кластеры прямых взаимодействий, что соответствует современным представлениям о механизмах действия препаратов на основе платины [4]. Среди отобранных генов есть те, функции которых напрямую не связаны с регуляцией клеточного цикла или репарацией ДНК, что представляет особый интерес для поиска среди них новых регуляторов чувствительности к платиновым препаратам.

Выводы. Генетические CRISPR/Cas9 скрининги библиотек генов РНК в клетках рака поджелудочной железы MIAPaCa-2 в присутствии платиновых препаратов позволили выявить 130 генов-кандидатов, потенциально участвующих в регуляции ответа на платиновые препараты. Полученные данные планируется использовать для дальнейшей работы по выявлению механизмов регуляции чувствительности клеток РПЖ к препаратам платины.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентной способности Казанского (Приволжского) федерального университета.

Литература:

1. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2009; 59(4): 225–49.
2. Wang T., Wei J., Sabatini D. et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9. *Science* 2014; 343(6166): 80–4.
3. Parnas O., Jovanovic M., Eisenhaure T. et al. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell* 2015; 162(3): 675–86.

4. Basu A., Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J. Nucleic Acids* 2010; 2010: pii:201367.

СД34

С.А. Смирнихина¹, А.А. Анучина¹,
К.С. Кочергин-Никитский¹,
Э.П. Адильгереева¹, А.В. Лавров^{1,2}

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК К МУТАЦИИ F508DEL В ГЕНЕ CFTR ПРИ МУКОВИЦИДОЗЕ

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

S.A. Smirnikhina¹, A.A. Anuchina¹,
K.S. Kochergin-Nikitsky¹, E.P. Adilgerееva¹,
A.V. Lavrov^{1,2}

INCREASE OF SGRNA ACTIVITY DESIGNED TO F508DEL MUTATION IN CFTR GENE IN CYSTIC FIBROSIS

¹ Federal State Budgetary Institution "Research Centre for Medical Genetics", Moscow, Russia

² The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia

smirnikhinas@gmail.com

Введение. Геномное редактирование с использованием CRISPR/Cas9 представляется наиболее подходящим методом генной терапии для коррекции мутации F508del в гене *CFTR* при муковисцидозе [1, 2]. Перспективным решением является разработка подхода к целевому редактированию только аллеля с мутацией.

Материал и методы. Исходная плазмида для CRISPR/Cas9 была подарена Feng Zhang (Addgene #71814). Плазмиды вводили в культуру клеток HEK293T с помощью кальций-фосфатной трансфекции [3]. Выделение ДНК проводили с помощью набора Genomic DNA-Tissue MiniPrep (ZymoResearch, США). РНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом. Экспрессию sgRNA оценивали с помощью количественной ПЦР на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Нормализацию экспрессии sgRNA проводили на ген *B2M* и плазмиду SpCas9. T7E1 анализ проводили как описано ранее [4].

Результаты исследования. Непосредственно на мутацию F508del возможно подобрать только одну sgRNA — sgCFTR#1, однако в клеточной культуре HEK293T она показала низкую эффективность образования инделов в комбинации с SpCas9 (13,8%), по сравнению с другими sgRNA к гену *CFTR* (13–18%), а также к гену *EGFP* (34,2%). Данные qPCR показали, что уровни экспрессии sgCFTR#1 и sgGFP через 0 и 7 ч. после трансфекции были низкими и не отличались друг от друга; однако через 24 ч. после трансфекции

уровень экспрессии sgGFP почти в 15 раз превышал уровень экспрессии sgCFTR#1, а через 30 ч. после трансфекции — в 22 раза. Были предприняты попытки увеличения экспрессии sgCFTR#1 путем добавления дополнительной экспрессирующей кассеты в плазмиду, слияния sgCFTR#1 с активной sgGFP и с помощью использования гибридного промотора, однако повышения эффективности sgCFTR#1 получено не было. Попытки стабилизировать sgCFTR#1 путем добавления в ее последовательность G-квадруплекса, укорочения и добавления GG в 5'-область также не принесли результатов. Культивирование трансфицированных клеток при более низкой температуре (24 ч. при 37 °C, затем 48 ч. при 30 °C) привело к двукратному снижению активности sgCFTR#1, не изменив при этом активность sgGFP.

Обсуждение. На наш взгляд, низкая эффективность работы sgCFTR#1 обусловлена ее низкой экспрессией, однако попытки увеличить экспрессию разными способами не принесли результатов. Предположив, что низкая экспрессия может быть обусловлена более быстрой деградацией sgCFTR#1, мы попытались стабилизировать эту направляющую РНК путем добавления в ее последовательность гуанидин-богатого участка, позволяющего сформировать G-квадруплекс [5], однако это тоже не увеличило экспрессию и активность sgCFTR#1. Известно, что до 41 % sgRNA не активны в отношении целевого локуса [6], по литературным данным причиной этому является определенный нуклеотидный состав sgRNA [6, 7], а также вторичные структуры, образуемые sgRNA [6].

Выводы. Не удалось повысить экспрессию и активность sgRNA, подобранной непосредственно на мутацию F508del в гене *CFTR*. Вероятно, низкая эффективность работы sgCFTR#1 является следствием ее нуклеотидной последовательности, что ограничивает ее применение и заставляет использовать другие ферменты Cas9, которые расширяют способность подбора sgRNA непосредственно на мутацию F508del.

Работа частично поддержана Российским научным фондом (соглашение 17-75-20095 от 25 июля 2017 г.), государственным заданием ФАНО России и Российской академией наук.

Литература:

1. Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum. Mol. Genet.* 2014; 23(R1): R40–6.
2. Maeder M.L., Gersbach C.A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.* 2016; 24(3): 430–46.
3. Смирнихина С.А., Банников А.В., Лавров А.В. Оптимизация условий трансфекции клеточной культуры CFTE290- для разработки редактирования мутации F508del в гене *CFTR*. *Медицинская генетика* 2016; 15(8): 36–9.
4. Смирнихина С.А., Банников А.В., Анучина А.А. и др. Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9 для коррекции мутации F508del при муковисцидозе. *Медицинская генетика* 2017; 16(11): 32–7.
5. Moreno-Mateos M.A., Vejnar C.E., Beaudoin J.D. et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat. Methods* 2015; 12(10): 982–8.
6. Liu X., Homma A., Sayadi J. et al. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19675.
7. Kuan P.F., Powers S., He S. et al. A systematic evaluation of nucleotide properties for CRISPR sgRNA design. *BMC Bioinformatics* 2017; 18(1): 297.

СД35

В.В. Соколов, Н.А. Золотарев, О.Г. Максименко
CRISPR-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ
АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ FU2 И CG1603,
УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ НОХ-ГЕНОВ
DROSOPHILA MELANOGASTER

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Институт биологии гена
 Российской академии наук, Москва, Россия

V.V. Sokolov, N.A. Zolotarev, O.G. Maksimenko
CRISPR-MEDIATED MUTAGENESIS
OF ARCHITECTURAL PROTEINS FU2 AND
CG1603 PARTICIPATING IN REGULATION
OF HOX-GENE CLUSTER IN DROSOPHILA
MELANOGASTER

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
 Moscow, Russia

volodjn@yandex.ru

Введение. Изучение регуляции экспрессии генов эукариот является актуальной задачей современной молекулярной биологии. Важную роль в регуляции транскрипции играет пространственная организация хроматина, которая поддерживается ДНК-связывающими архитектурными белками [1]. Моделью для изучения регуляции транскрипции с участием архитектурных белков является кластер НОХ-генов дрозофилы — Bithorax-комплекс. В функционировании границ этого комплекса генов участвуют ранее описанные архитектурные белки: CTCF, Pita и другие [2]. В данной работе мы изучаем новые белки Fu2 и CG1603, возможно, участвующие в работе архитектурных элементов Bithorax-комплекса.

Материал и методы. Методики проведения иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq), изменения подвижности ДНК-белковых комплексов в геле (EMSA), дрожжевой двугибридной системы (Y2H) описаны в статье [3].

Для внесения делеций и последующего восстановления генов, кодирующих изучаемые белки, использовали измененную методику из статьи [3], основанную на CRISPR/Cas9-индуцированной гомологической рекомбинации с последующей сайт-специфической интеграцией.

Результаты исследования. С помощью дрожжевой двугибридной системы было обнаружено взаимодействие белков Fu2 и CG1603 с белком CP190 — общим кофактором всех известных инсуляторных белков дрозофилы. С помощью ChIP-seq было обнаружено 967 и 391 пиков связывания белков CG1603 и Fu2 соответственно. Также было обнаружено, что часть пиков совпадает с описанными границами в регуляторной области Bithorax-комплекса. EMSA-анализ подтвердил, что исследуемые белки могут напрямую связываться с предсказанными мотивами. Это позволило нам предположить, что белки Fu2 и CG1603 обладают сходными функциями с ранее описанными архитектурными белками и участвуют в функционировании границ Bithorax-комплекса.

Для получения линий мух с делецией исследуемых генов, мы изменили метод, прежде использованный в нашей лаборатории [3]. В исходной версии метода CRISPR/Cas9 разрезал ДНК в первом интроне и в 3'-конце гена. В результате гомологической рекомбинации происходила интеграция плазмиды, несущей сайт attP и маркерный ген *mCherry*. Сайт attP использовался для интеграции плазмиды, восстанавливающей последовательность гена. Для вырезания маркерных генов использовали Cre/lox-рекомбинацию.

При этом lox-сайт оставался в интроне и не влиял на транскрипцию, сплайсинг и образующийся белок.

В генах *CG1603* и *fu2* первый экзон кодирует домены, потенциально участвующие в реализации архитектурной функции, поэтому мы изменили схему эксперимента. Мы вносим 5'-концевой разрез выше точки начала транскрипции, чтобы иметь возможность изменять первый экзон. Для бесшовного восстановления промотора мы добавили сайты узнавания мегануклеазы I-SceI. В результате разрезания I-SceI и гомологической рекомбинации будет восстановлена последовательность промотора дикого типа. Также мы изменили ориентацию используемой трансгенной конструкции в геноме, чтобы иметь возможность проводить манипуляции с линиями дрозофил без вырезания маркерных генов.

Обсуждение и выводы. Мы планируем проверить генетическое взаимодействие полученных делеций по генам *fu2* и *CG1603* с мутациями генов других инсуляторных белков.

Используемая нами система позволяет модифицировать ген, получая белки с делециями функциональных доменов. Это поможет нам изучить взаимодействие белков CG1603 и Fu2 с другими белками *in vivo*, а также проверить нарушение регуляции Bithorax-комплекса при изменении исследуемых белков.

Таким образом, используемый нами подход CRISPR/Cas9-опосредованного мутагенеза генов, кодирующих исследуемые белки, позволит изучить их роль в регуляции Нох-генов дрозофилы.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-24-00166.

Литература:

1. Cubañas-Potts C., Corces V.G. Architectural proteins, transcription, and the three-dimensional organization of the genome. *FEBS Lett.* 2015; 589(20): 2923–30.
2. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V. et al. Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res.* 2015; 25(1): 89–99.
3. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(21): 12285–300.

СД36

Л.А. Степаненко, Ю.П. Джигоев, О.В. Колбасеева,
А.Ю. Борисенко, В.И. Злобин

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПОИСКУ ФАГОВ
ЧЕРЕЗ СПЕЙСЕРНЫЕ САЙТЫ CRISPR/
CAS-СИСТЕМЫ KLEBSIELLA PNEUMONIAE
PITNDM01

Иркутский государственный медицинский
 университет, Иркутск, Россия

L.A. Stepanenko, Yu.P. Dzhiyoev, O.V. Kolbaseeva,
A.Yu. Borisenko, V.I. Zlobin

DEVELOPMENT OF APPROACHES
TO SEARCHING FOR PHAGES THROUGH
SPISER SITES CRISPR/CAS SYSTEMS
KLEBSIELLA PNEUMONIAE PITNDM01

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

steplia@mail.ru

Введение. В современном мире появление полирезистентных штаммов представляет собой серьезную

проблему. К наиболее распространенным возбудителям инфекций с множественной лекарственной устойчивостью можно отнести бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, преимущественно *Klebsiella pneumoniae* [1]. Исследование присутствия и характеристик CRISPR в бактериях, представляющих собой тип врожденного иммунитета, обнаруженный у прокариот, позволит разработать новые подходы в лечении данных инфекций с использованием высокоспецифичных бактериофагов.

Цель исследования — на примере штамма *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 изучить структуру CRISPR/Cas-систем, провести поиск и анализ фагов через расшифрованные спейсерные последовательности в CRISPR-кассете при помощи методов биоинформатики.

Материал и методы. В качестве объекта была взята геномная последовательность *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 (NZ_CP006798.1), загруженная из базы данных GenBank. Для поиска CRISPR/Cas системы использовались методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2). Поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществлялся при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались онлайн-приложения «CRISPR: a CRISPR RInteractive database». Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение «CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets» [2, 3, 5].

Результаты исследования и обсуждение. Штамм *Klebsiella pneumoniae* PittNDMO1 был изолирован в больнице в Питтсбурге, штат Пенсильвания (США) из образца мочи пациента, госпитализированного с лихорадкой и субарахноидальным кровоизлиянием. Данный штамм оказался устойчивым ко всем β-лактамам, включая карбапенемы, аминогликозиды и фторхинолоны, но оставался восприимчивым к фосфомицину и колистину [4]. Его полный геном расшифрован в феврале 2017 года. CRISPR/Cas-система данного штамма включает две CRISPR-касеты, имеющих размеры 764 и 577 н.о. В структуре CRISPR-1 идентифицировано 12 спейсерных участков (35 н.о.), в CRISPR-2 обнаружено девять спейсеров размером 33 н.о. В непосредственной близости от кассет находятся Cas-гены, которые их обслуживают. Обнаруженные Cas-гены позволили отнести CRISPR/Cas-систему к CAS-Type-IA. Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал, что в CRISPR-1 из 12 спейсеров 10 полностью соответствуют протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий рода *Streptomyces*, *Gordonia*, *Rhodococcus* и *Mycobacterium*. К спейсеру 12, который, возможно, относится к более «древнему», так как находится в конце локуса CRISPR-1, не было выявлено полного совпадения фагов из известной базы данных. В CRISPR-2 установлена полная идентификация восьми спейсеров протоспейсерам фагов к бактериям рода *Propionibacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*. Таким образом, изучение структур спейсеров CRISPR-кассет и их соответствие протоспейсерам свидетельствуют об эволюционной истории и адаптационных возможностях данного штамма, выявляют активные в отношении данного штамма бактериофаги.

Выводы. Данные исследования позволяют получать информацию о предполагаемой устойчивости CRISPR/Cas-системы данного штамма к обнаруженным фагам, о патогенных свойствах возбудителя и осуществлять подходы к созданию персонализированной фаготерапии и фагопрофилактики.

Литература:

1. Shen J., Lv L., Wang X. et al. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J. Basic Microbiol.* 2017; 57(4): 325–36.
2. Abby S.S., Néron B., Ménager H. et al. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS One* 2014; 9(10): 110–25.
3. Babu M., Beloglazova N., Flick R. et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol. Microbiol.* 2011; 79(2): 484–502.
4. Doi Y., Hazen T.H., Boitano M. et al. Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(10): 5947–53.
5. Борисенко А.Ю., Джигоев Ю.П., Парамонов А.И. и др. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)* 2015; 2(133): 71–4.

СД37

А.В. Хромов^{1,2}, А.В. Махотенко^{1,2}, Е.А. Снигирь¹, С.С. Макарова^{1,2}, В.В. Макаров^{1,2}, Т.П. Супрунова¹, Н.О. Калинина^{1,2}, М.Э. Тальянский^{1,3}

БЕСПЛАЗМИДНАЯ ДОСТАВКА РНП-КОМПЛЕКСОВ CRISPR/CAS9 В КЛЕТКИ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM*

¹ ООО «Дока-Генные технологии», Рогачёво, Московская область, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пушкино, Россия

A.V. Khromov^{1,2*}, A.V. Makhotenko^{1,2}, E.A. Snigir¹, S.S. Makarova^{1,2}, V.V. Makarov^{1,2}, T.P. Suprunova¹, N.O. Kalinina^{1,2}, M.E. Taliansky^{1,3}

DNA-FREE DELIVERY OF CAS9/GRNA RIBONUCLEOPROTEINS (RNPS) INTO CELLS OF APICAL MERISTEMS OF *SOLANUM TUBEROSUM*

¹ ООО «Doka-Gennie Tekhnologii», Rogachovo, Moskovskaya Oblast, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ BIBCh, Puschino, Russia

warfolomey@gmail.com

Введение. Благодаря своей простоте, практичности и эффективности технология CRISPR-Cas9 широко применяется для редактирования генома на различных эукариотических системах, включая животных и растения. Однако существующие методы направленной доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки растений с использованием агробактерий/плазмидной ДНК ограничивают возможности применения данной технологии в растениеводстве, поскольку относятся к технологиям генетической модификации организмов (ГМО). В настоящей работе мы описываем новый бесплазмидный способ доставки предварительно собранных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов Cas9-гидовая РНК в клетки

апикальной меристемы картофеля (*Solanum tuberosum*, cv Chicago) с помощью микрочастиц хитозана с использованием вакуумной инфльтрации или методом биобаллистики микрочастицами золота с последующей регенерацией растений с отредактированными аллелями гена фитоен десатуразы.

Материал и методы. Редактирующий РНП-комплекс формировали *in vitro* с использованием рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 (EnGen® Cas9 NLS, *S. pyogenes*, NEB) и синтезированной *in vitro* гидовой РНК, последовательность которой для гена фитоен десатуразы картофеля была подобрана с помощью биоинформатического веб-сервиса, а активность проверена *in vitro* на целевом фрагменте гена [1]. Апикальные меристемы (размером около 100–200 мкм) выделяли из зеленых ростков пазушных почек растений *in vitro* картофеля сорта Чикаго и помещали в чашки Петри. Биобаллистику золотыми микрочастицами, функционализированными РНП-комплексами, проводили с помощью генной гелевой пушки PDS-1000/He (Bio-Rad). Инфльтрацию клеток функционализированными микрочастицами хитозана проводили в вакуумной камере генной в специально подобранных условиях [2].

Регенерацию растений из меристем проводили на среде с добавлением фитогормонов антибиотика в световом модуле в контролируемых условиях в течение 3–4 недель. Регенерированные растения достигали стадии 3–4 междоузлий за 4–5 недель, причем до 80% меристем развивались в нормальные растения. Из линий растений с симптомами появления целевого признака (обесцвечивания листьев) выделяли тотальную ДНК. Фрагмент целевой последовательности длиной 186 нт амплифицировали, клонировали в вектор pAL2TA (Евроген) и полученные конструкции трансформировали в *E. coli*. Для всех линий получали 30 колоний и секвенировали плазмидную ДНК. Уровень экспрессии гена фитоен десатуразы оценивали методом количественной ПЦР.

Результаты исследования и обсуждение. Для отработки метода бесплазмидной доставки системы CRISPR/Cas9 (РНП-комплексов) в клетки растений картофеля и тестирования ее активности как редактора генома мы использовали в качестве модельного гена ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу. Фитоен десатураза катализирует ключевой этап биосинтеза каротиноидов, защищающих хлорофилл от фотоокисления; таким образом, выключение (нокаут) этого гена приводит к появлению белых пятен на листьях растения. Преформированный редактирующий РНП-комплекс, содержащий эндонуклеазу Cas9 и короткую гидовую РНК, доставляли в клетки апикальной меристемы растений картофеля методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота и с помощью вакуумной инфльтрации функционализированными микрочастицами хитозана. Визуальная оценка полученных растений-регенерантов показала, что эффективность редактирования (побеление листьев растений) при доставке редактора методом биобаллистики составила 2 линии из 90, а методом инфльтрации — 13 линий из 115. Проведенный генетический анализ отобранных линий выявил редактирование двух аллелей целевого гена при доставке РНП-комплекса биобаллистическим методом и одного аллеля при использовании метода инфльтрации. Генетические данные подтверждены ингибированием экспрессии целевого гена в обеих линиях растений-регенерантов и временным побелением растений отредактированных линий. Предложенные методы бесплазмидной доставки РНП-комплекса белка Cas9 и короткой гидовой

РНК в клетки апикальной меристемы перспективны для разработки эффективной технологии редактирования генома полиплоидных культур для создания в короткие сроки нетрансгенных (не содержащих гетерологичных последовательностей ДНК) растений с отредактированными целевыми генами.

Выводы.

1. Разработан метод бесплазмидной доставки редактирующего РНП-комплекса Cas9/короткая гидовая РНК в клетки апикальной меристемы картофеля;
2. Получены линии растений картофеля с отредактированными аллелями гена фитоен десатуразы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04019).

Литература:

1. Хромов А.В., Гушин В.А., Тимербаев В.И. и др. Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/CAS9. Доклады Академии наук 2018; 479(3): 343–7.
2. Makhotenko A.V., Snigir E.A., Kalinina N.O. et al. Data on a delivery of biomolecules into *Nicotiana benthamiana* leaves using different nanoparticles. Data Brief 2017; 16: 1034–7.

СД38

И.А. Яковлев^{1–4}, И.Г. Старостина²,
А.А. Шаймарданова², Д.Р. Аглиуллина²,
В.В. Соловьева², А.А. Ризванов²,
А.А. Исаев¹, Р.В. Деев^{1, 3, 4}

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ (МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ) С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И ПРОВЕРКИ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

¹ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

⁴ ООО «Генотаргет», Москва, Россия

I.A. Yakovlev^{1–4}, I.G. Starostina²,
A.A. Shaymardanova², D.R. Agliullina²,
V.V. Soloveva², A.A. Rizvanov², A.A. Isaev¹,
R.V. Deev^{1–4}

GENERATION OF CELLULAR TEST-SYSTEMS (DISEASE MODELS) WITH GENOME EDITING FOR DEVELOPMENT AND VERIFICATION OF METHODS OF HEREDITARY MUSCLE TISSUE DISEASES GENE THERAPY

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³ Ryazan State Medical University n. a. I.P. Pavlov, Ryazan, Russia

⁴ Genotarget LLC, Moscow, Russia

ivan@ivan-ya.ru

Мышечные дистрофии характеризуются первичным поражением мышечной ткани, развивающимся непрерывно-прогредиентно, зачастую приводят

к инвалидности в трудоспособном возрасте, а также к смерти в детском и подростковом возрасте. Общая распространенность мышечных дистрофий составляет 19.8-25.1:100000, наиболее распространенная — миодистрофия Дюшенна (1:3300 новорожденных мальчиков), а также высоко распространена группа поясно-конечностных мышечных дистрофий (от 1:14500 до 1:123000). Этиотропного лечения этих заболеваний на сегодняшний день не существует. В связи с тем, что миодистрофии вызваны мутациями в генах, кодирующих мышечные белки, наиболее оптимальным подходом является генная терапия, целью которой является коррекция генетического материала клетки на уровне РНК или ДНК. В исследованиях по разработке генной терапии мышечных дистрофий возникает необходимость проанализировать тот или иной подход (редактирование ДНК, РНК, оверэкспрессия, а также доставку терапевтических молекул при помощи различных векторов) не только теоретически, но и *in vitro*. Учитывая распространенность миодистрофий, зачастую «труднодоступность» пациентов, многообразие мутаций и форм заболеваний, взятие биоптата для выделения и культивирования клеток в условиях лаборатории с целью проверки различных геннотерапевтических подходов зачастую весьма затруднительно, или невозможно. Кроме этого, для создания молекул, действующих целенаправленно, на определенный участок ДНК или РНК, требуются образцы клеток, имеющих соответствующую мутацию. Таким образом, необходимо создание клеточных тест-систем (моделей заболеваний) в условиях лаборатории из уже имеющегося или легкодоступного биоматериала (стандартные клеточные линии, ткани лабораторных животных, биоптат от здоровых доноров) . Наиболее оптимальным

сегодня является применение системы геномного редактирования CRISPR\Cas9.

В нашей работе мы использовали человеческие фибробласты и активировали экспрессию дисферлина с использованием системы активации транскрипции CRISPR-Cas9 SAM. Фибробласты были получены от пациента с мутацией в 26 экзоне гена DYSF и immortalized путем shRNA-нокдауна мРНК онкосупрессора p53. Отсутствие экспрессии p53 в генетически модифицированных фибробластах было подтверждено вестерн-блот-анализом и ПЦР в реальном времени. Для транскрипционной активации immortalized фибробластов использовали рекомбинантные лентивирусы, кодирующие транскрипционные факторы MS2-P65-HSF1, dCas9-VP64 и гидовую РНК. Экспрессия дисферлина была подтверждена qPCR. Наши результаты подтверждают, что фибробласты, полученные от пациентов, могут транскрипционно активироваться для экспрессии мутантной ДНК-мРНК DYSF и могут быть использованы в дальнейших исследованиях редактирования ДНК и РНК для создания новых геннотерапевтических подходов.

Кроме этого, мы выполнили дизайн и получили лентивирусные частицы с системой CRIPSR\Cas9, а также донорские ДНК, содержащие участок с мутацией, идентичной той, что имеется у пациентов, проживающих в труднодоступном регионе. С помощью лентивирусного вектора нами осуществлено моделирование мутации в 3 экзоне гена DYSF (с. 573–574 TG>AT) в клетках HEK293T, впоследствии будет выполнена транскрипционной активацией гена DYSF при помощи CRIPSR\Cas9-SAM. Таким образом, нами будет получена *in vitro* тест-система для отработки точных молекулярных инструментов для редактирования ДНК и РНК, а также подходов, связанных с оверэкспрессией белка дисферлина.

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 полутреними интервалами между строчками, со стандартными полями (слева — 3 см, справа — 1 см, сверху и снизу — 2,5 см) должны быть отправлены по адресу:

119333 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.

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 A4, 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 hypospadias: 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 отписки 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.

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 statistic 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.

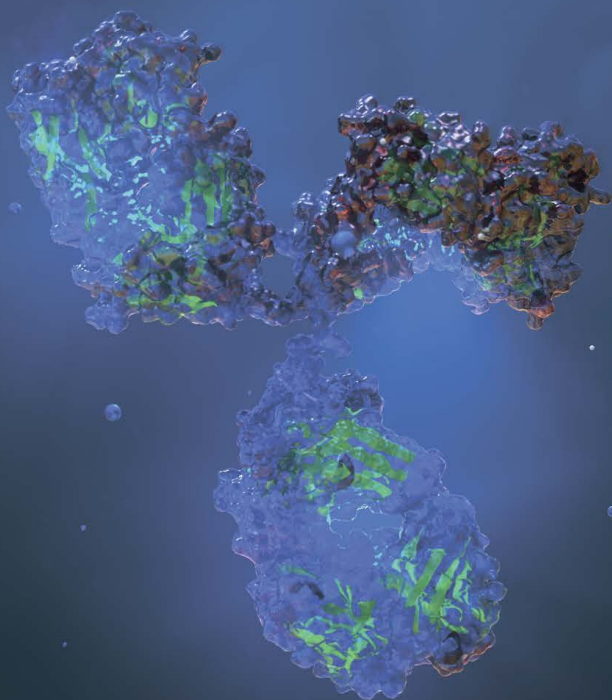
Historical material:

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>.

BIOCAD – международная инновационная биотехнологическая компания, объединяющая научно-исследовательский центр мирового уровня, современное фармацевтическое производство, доклинические и клинические исследования



Сегодня в портфеле компании уже 9 инновационных препаратов на основе моноклональных антител к различным мишеням, включая оригинальный противоопухолевый препарат на основе антител к рецептору программируемой гибели Т-лимфоцитов, получившему название PD-1. Также специалисты компании ведут проекты по созданию препаратов для иммунотерапии на основе так называемых малых молекул и разработке направления CAR-T клеточной терапии и мРНК-вакцин.

БЮСАД СОЗДАЛ СОБСТВЕННУЮ ИНФРАСТРУКТУРУ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ:

>40

препаратов на разных стадиях разработки:
37 биологической природы,
8 химической природы

700

сотрудников
задействовано
в R&D

26

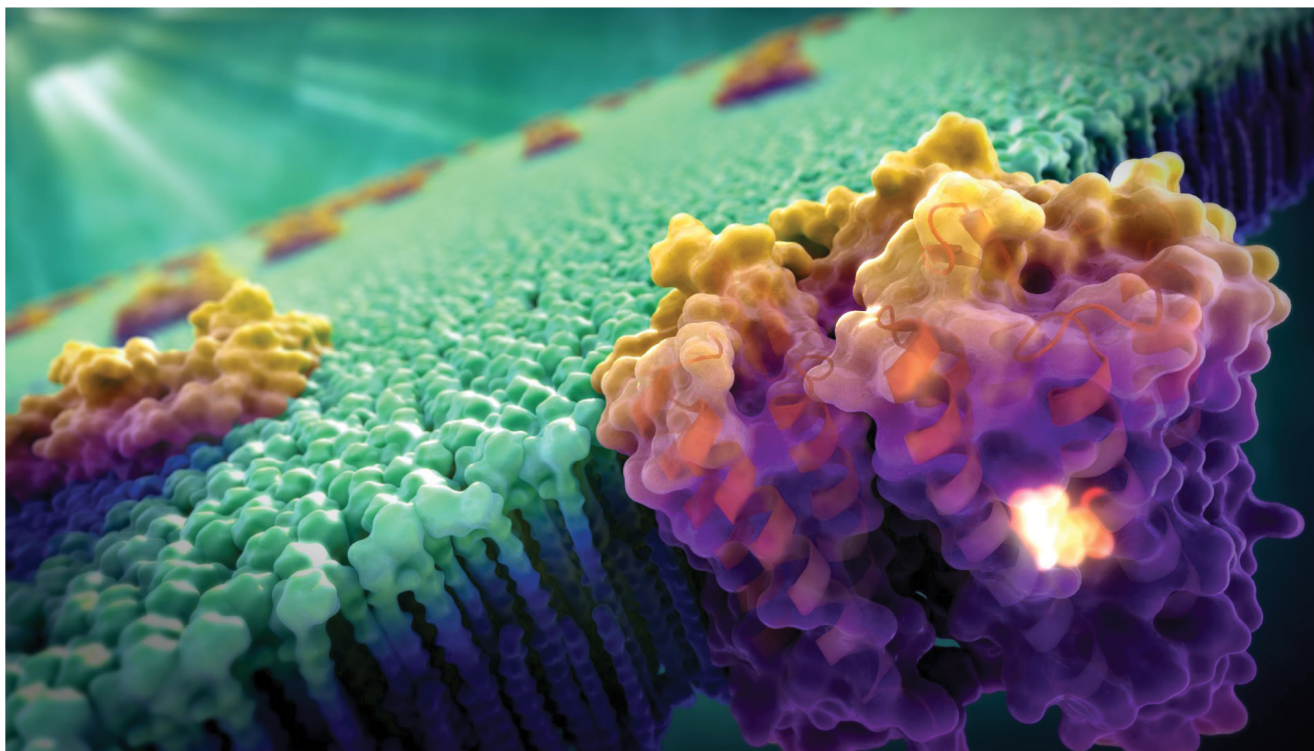
лабораторий

4

производственные
площадки

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

в науке и клинической практике



- Поставка клеточных линий
- Оснащение лабораторий
- Системы визуализации
- Реагенты для культуральных работ
- Антитела и красители
- Лабораторный пластик

Организация обучения:

Навыки культивирования in vitro
Курсы проточной цитометрии



Россия, 199106, Санкт-Петербург
Большой пр. В.О., д.68, лит. А
Тел./факс: (812) 3050606
ls@biovitrum.ru

Россия, 127287, г. Москва,
ул. 2я Хутурская, д. 38А, стр. 8, этаж 7
Тел./факс: (495) 7874046
ls@biovitrum.ru

Россия, 630091, г.Новосибирск,
ул. Советская 52, офис 415 А
Тел./факс: (383) 2304900
ls@biovitrum.ru

Региональные представители: г. Казань; г. Уфа; г. Нижний Новгород; г. Владивосток; г. Екатеринбург; г. Челябинск; г. Хабаровск.

МОДЕЛИРУЙТЕ - СОЗДАВАЙТЕ - ВНЕДРЯЙТЕ ИННОВАЦИИ **CRISPR**

Ваш полный набор инструментов CRISPR для редактирования генома

- Самое большое коммерческое скрининговое портфолио от компании Merck - лидера в лентивирусном производстве
- SygRNA™, синтетический crRNA и tracrRNA, в соединении с белком Cas9 позволит Вам улучшить результаты экспериментов
- Феноменальный proxi-CRISPR метод, расширяющий Ваши возможности в редактировании генов!
- Уникальная программа партнерства. Посетите сайт SigmaAldrich.com/crisprcore для получения более подробной информации.

Для получения более подробной информации,
пожалуйста, посетите наш сайт
SigmaAldrich.com/CRISPR



ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35
Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com

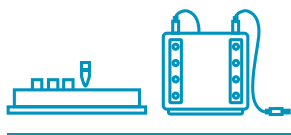
В США и Канаде life science подразделение
Merck работает под наименованием MilliporeSigma.





Компания Хеликон обеспечивает полный рабочий процесс необходимым оборудованием и расходными материалами для молекулярной и клеточной биологии и прикладных исследований.

ДЕЛАЕМ ВОЗМОЖНОЙ РАБОТУ ЛАБОРАТОРИЙ В РОССИИ НА МИРОВОМ УРОВНЕ



ООО «Компания Хеликон» поставляет передовые решения ведущих мировых брендов и производит лабораторное оборудование для молекулярной биологии.

Подробнее на сайте www.helicon.ru



ДОСТАВКА



ОБУЧЕНИЕ



**СЕРВИСНОЕ
ОБСЛУЖИВАНИЕ**



**МЕТОДИЧЕСКАЯ
ПОДДЕРЖКА**

Центральный офис:

119991 г. Москва, Ленинские Горы, МГУ, д. 1, стр. 40
Тел. 8 (800) 770-71-21 Факс +7 (495) 930-00-84
mail@helicon.ru

www.helicon.ru

Представительство в Сибирском регионе:

630090 г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел. +7 (383) 207-84-85, novosibirsk@helicon.ru

Представительство в Северо-Западном Регионе:

195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская д. 22 корп. 1
Тел. +7 (812) 244-85-52, spb@helicon.ru

Представительство в Приволжском регионе:

420021 г. Казань, ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел. +7 (843) 202-33-37, volga@helicon.ru

Представительство в Южном регионе:

344116 г. Ростов-на-Дону, ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а
Тел. +7 (863) 294-87-66, rostov@helicon.ru



Nikon Instruments – мировой лидер в разработке и производстве оптических и цифровых технологий для биомедицинских приложений. Мы поставляем оптические системы «под ключ» – отточенные до мелочей, мощные и производительные. Наши главные продукты – микроскопы и стереомикроскопы, камеры и программное обеспечение. Сервис и поддержка от производителя на территории России

Ti2 – микроскоп для прижизненной визуализации

ПО NIS Elements, управляемые компоненты микроскопа Никон, внешние диодные осветители, камеры Никон и топовые камеры других брендов дают возможность сверхбыстрой совместной работы для высокоскоростной автоматизированной съемки, когда требуется быстро и воспроизводимо переключаться между разными позициями, разными каналами флуоресценции и даже методами наблюдения

Ti2-E – идеальный микроскоп для Вашей конфокальной системы

На базе одного микроскопа Ti2-E могут комбинироваться конфокальные системы с системами суперразрешения N-SIM и N-STORM в различных сочетаниях – теперь с возможностью автоматической смены метода визуализации в процессе автоматизированной съемки



C2+ с детектором DUVB на основе GaAsP PMT: бескомпромиссное качество изображения. Чтобы снизить стоимость, мы снизили характеристики, влияющие на производительность – но не на качество

A1R+ HD – конфокальный микроскоп с резонансным сканером 1024x1024 пикселей, с возможностью одновременной съемки до 4 каналов флуоресценции с частотой до 15 кадров/с при полном разрешении

A1R MP+ — система для получения мультифотонных изображений, объединённая с конфокальным микроскопом

Сверхбыстрая визуализация с высоким разрешением. Высокая яркость при съемке даже на большой глубине с лазером до 1300нм. Возможно использование двух инфракрасных лазеров, возбуждение видимыми лазерами.

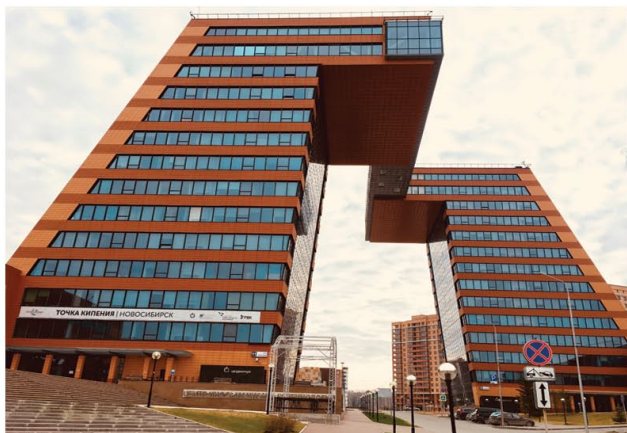
CFI Apochromat 25xW MP1300 — новый объектив с апертурой 1,1 и рабочим расстоянием 2,0 мм для съемки на большой глубине, с превосходным пропусканием в широчайшем диапазоне длин волн.



С характеристиками и примерами использования нашей продукции вы можете более полно ознакомиться на нашем сайте или задав вопрос специалистам: +7 495 663 77 64
microscopy@nikon.ru

www.nikoninstruments.com





КОМПАНИЯ ОСУЩЕСТВЛЯЕТ АНАЛИТИЧЕСКУЮ ПОДДЕРЖКУ

- Омиксных исследований
- Биотехнологических компаний
- Диагностических центров
- Биобанков
- Обрабатывает данные секвенирования NGS



РЕЗИДЕНТ НОВОСИБИРСКОГО АКАДЕМПАРКА

Компания представлена в Новосибирске, Москве, Санкт-Петербурге, Роквилле (США)

Основные клиенты из США, Европы, Китая, России

КОМПАНИЯ ВЕДЁТ РАЗРАБОТКИ НА СТЫКЕ ДИСЦИПЛИН

- Биоинформатика
- Машинное обучение
- Программирование
- Медицина

ДМИТРИЙ НИКОЛАЕВИЧ ШТОКАЛО

К. Ф. - М. Н., ДИРЕКТОР

“Наша стратегия – обеспечить общение на одном языке математиков, биологов, программистов, биоинформатиков и врачей. Это необходимо для решения задач современной медицины”.



ГОД ОСНОВАНИЯ 2004

invitrogen



CRISPR

Редактирование генома
начинается здесь

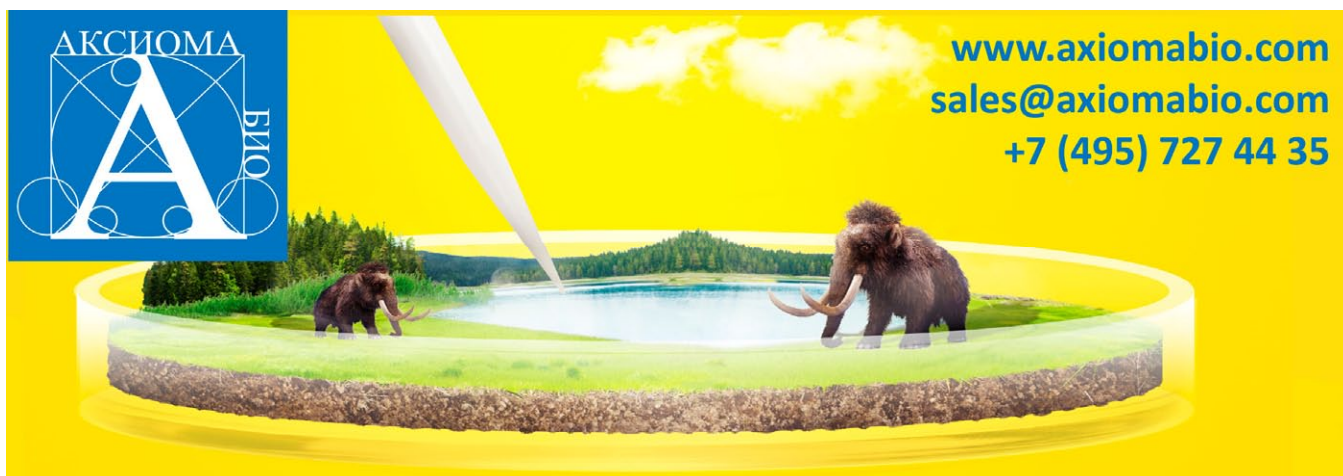
Узнайте больше о технологии и
продуктах GeneArt® CRISPR
на нашем сайте www.thermofisher.com

8 (495) 651 6797

Московское представительство

Только для исследовательских целей. Не предназначено для диагностических процедур. © 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Все права защищены. Все торговые марки являются собственностью компании Thermo Fisher Scientific или ее дочерних предприятий, если не указано иначе.

ThermoFisher
SCIENTIFIC



Поставка реактивов и расходных материалов в кратчайшие сроки!

- Оборудование и наборы для NGS и изучения геномики единичных клеток (TaKaRa, Clontech, Rubicon Genomics, Wafergen)
- Реагенты и наборы для протеомики (Zymo Research, Takara BIO, BioLegend, PeproTech)
- Редактирование генома, в т.ч. система CRISPR-Cas9 (Takara BIO)
- Ферменты и наборы для молекулярной биологии (Zymo Research, Takara BIO, InvivoGen, MRC)
- Рекombинантные белки и антитела (BioLegend, Peprotech),
... и многое другое

Безграничные возможности. Что создадите Вы?

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ НЕВОЗМОЖНО БЕЗ ПЦР!

ООО «Биолабмикс»

www.biolabmix.ru

г. Новосибирск

sales@biolabmix.ru

Мы знаем, как сделать ПЦР проще и удобнее!



В нашем каталоге: наборы и готовые миксы для ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ДНК-маркеры, наборы и реагенты для выделения геномной ДНК и суммарной РНК.

БУДЬТЕ С НАМИ НА ВОЛНЕ НАУЧНОГО ТРЕНДА!*

***Акция!** Участникам CRISPR-2018 Скидка 10 % до 15 декабря 2018 года по промокоду CRISPR&PCR!





ООО «Био-Рад Лаборатории»

105064, Москва, Нижний Сусальный пер., дом 5, стр. 5А

Тел.: (495) 721-14-04

Факс: (495) 721-14-12

info_russia@bio-rad.com

www.bio-rad.com



Подразделение молекулярно-биологических технологий компании Bio-Rad предлагает широкий спектр приборов, реагентов, расходных материалов и программного обеспечения для исследований в областях клеточной биологии, экспрессии генов, очистки белков, количественного определения белков, разработки и производства лекарств и обучения биологическим наукам. Bio-Rad входит в пятерку ведущих мировых производителей в области наук о жизни.

Наши продукты и решения используются для разделения, очистки, идентификации, анализа и амплификации биологических объектов, таких как антитела, белки, нуклеиновые кислоты, клетки и бактерии. Технологии и области применения включают в себя электрофорез, визуализацию, мультиплексный иммуноанализ, хроматографию, микробиологию, анализ функций белка, трансфекцию, проточную цитометрию и сортировку клеток, а также амплификацию, в том числе в режиме реального времени или цифровой ПЦР. Продукты Bio-Rad помогают проводить фундаментальные и прикладные исследования в лабораториях по всему миру.





ГАЛА - ТРЕЙД
www.GALATRADE.RU



ТД «Гала-Трейд»

является официальным представителем
Sigma-Aldrich и **J&K Scientific**.

Осуществляем прямые поставки химических реактивов и стандартов
для всех этапов исследований и производств от ряда
ведущих европейских, американских
и канадских производителей.



SIGMA-ALDRICH



J&K Scientific

Integrated Scientific & Industrial Resource Platform

Tel: 8 (812) 955-04-24
e-mail: info@galatrade.ru

www.galatrade.ru



www.genescells.ru