



CRISPR-2025

3-Й МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

5-10 октября 2025, Ереван, Армения

3RD INTERNATIONAL CONGRESS

October 5-10, 2025, Yerevan, Armenia

CELL TECHNOLOGIES
REGENERATIVE MEDICINE
INTELLIGENT DATA SCIENCE
SYNTHETIC BIOLOGY
POSTGENOME
RESearch & DEVELOPMENT

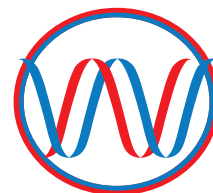


CELL TECHNOLOGIES
REGENERATIVE MEDICINE
INTELLIGENT DATA SCIENCE
SYNTHETIC BIOLOGY
POSTGENOME
RESEARCH & DEVELOPMENT

YEREVAN
ARMENIA
2025

INTERNATIONAL CONGRESS
CRISPR-2025

Organizers



BIOSCAD

Biotechnology Company

Partners



FOUNDATION FOR SCIENTIFIC
AND TECHNOLOGICAL
DEVELOPMENT OF YUGRA



Infopartners

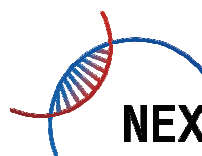


ВАВИЛОВСКОЕ
ОБЩЕСТВО
ГЕНЕТИКОВ
И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ
(ВОВИС)

ВАВИЛОВСКИЙ
ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ
VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Letters
to **VAVILOV JOURNAL**
OF GENETICS AND BREEDING

Sponsors



NEXTGENSEQ.TECH



illumina
AUTHORIZED
CHANNEL PARTNER



OCTOBER 5 -10, 2025

YEREVAN, ARMENIA

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Российско-Армянский университет
Russian-Armenian University

CRISPR-2025

3-Й МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС
5–10 ОКТЯБРЯ 2025, ЕРЕВАН, АРМЕНИЯ

3RD INTERNATIONAL CONGRESS
OCTOBER 5–10, 2025, YEREVAN, ARMENIA

Тезисы докладов
Abstracts

Новосибирск
ИЦиГ СО РАН
2025

CRISPR-2025: 3-й международный конгресс (5–10 октября 2025 г., Ереван, Республика Армения): тезисы докладов / Федер. исслед. центр Ин-т цитологии и генетики Сиб. отделения Рос. академии наук; Российско-Армянский ун-т. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2025. 157 с. Doi. 10.18699/CRISPR-2025-abstracts. ISBN 978-5-91291-073-9

CRISPR-2025: 3rd International Congress (October 5–10, 2025, Yerevan, Republic of Armenia): Abstracts / Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Russian-Armenian University. Novosibirsk: ICG SB RAS, 2025. 157 p. Doi. 10.18699/CRISPR-2025-abstracts. ISBN 978-5-91291-073-9

ОРГАНИЗАТОРЫ / ORGANIZERS

- Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
- Российско-Армянский университет
Russian-Armenian University
- Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
- Институт молекулярной биологии
Национальной академии наук Республики Армения
Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia
- Сургутский государственный университет
Surgut State University
- Национальная академия наук Республики Армения
National Academy of Sciences of the Republic of Armenia



Информационный сайт конгресса / Congress website
crispr2025.rau.am

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ / ORGANIZING COMMITTEE

Председатели / Chairs

Закиян Сурен Минасович

д.б.н., профессор, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Suren Zakian

D.Sci., Prof., Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Аракелян Арсен Арташесович

д.б.н., Институт биомедицины и фармации РАУ, Институт молекулярной биологии НАН РА

Arsen Arakelyan

Institute of Biomedicine and Pharmacy RAU, Institute of Molecular Biology NAS RA

Заместители Председателей / Vice-Chairs

Захарова Ирина Сергеевна

к.б.н., Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации

Irina Zakharova

PhD, Research Institute of Technical Physics and Automation

Дементьева Елена Вячеславовна

к.б.н., Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Elena Dementyeva

PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Захарян Роксана Владиславовна

к.б.н., Институт биомедицины и фармации РАУ

Roksana Zakharyan

PhD, Institute of Biomedicine and Pharmacy RAU

Члены Организационного комитета / Members of the Organizing Committee

Кочетов Алексей Владимирович

академик РАН, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Alexey Kochetov

Academician of RAS, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Арутюнян Рубен Михайлович

чл.-корр. НАН Армении, Национальная академия наук Республики Армения, Ереванский государственный университет

Rouben Aroutiounian

Corr.-Member NAS RA, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan State University

Нанушян Лена Мануковна

Министерство здравоохранения Республики Армения

Lena Nanushyan

Ministry of Health of the Republic of Armenia

Енкоян Константин Борисович

д.б.н., профессор, Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

Konstantin Yenkovyan

D.Sci., Prof., Yerevan State Medical University

Власов Валентин Викторович

академик РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Valentin Vlasov

Academician of RAS, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Коваль Владимир Васильевич

д.х.н., доцент, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Vladimir Koval

D.Sci., Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Лаврик Ольга Ивановна

академик РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Olga Lavrik

Academician of RAS, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Коваленко Людмила Васильевна
д.м.н., профессор, Сургутский государственный
университет

Ткач Андрей Владимирович
Фонд научно-технологического развития Югры

Зубова Светлана Васильевна
Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Орлова Галина Владимировна
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Сергей Петрович Медведев
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Шевченко Александр Игоревич
к.б.н., Научно-исследовательский институт
технической физики и автоматизации

Малахова Анастасия Александровна
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Григорьева Елена Викторовна
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Павлова Софья Викторовна
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Макеева Владлена Сергеевна
Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Сорогина Диана Александровна
Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Зуева Александра Сергеевна
Новосибирский государственный университет

Арамян Ани Гагиковна
Российско-Армянский университет

Ирицян Луиза Сергеевна
Российско-Армянский университет

Lyudmila Kovalenko
D.Sci., Prof., Surgut State University

Andrey Tkach
Foundation for Scientific and Technological
Development of Yugra

Svetlana Zubova
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of
the Russian Academy of Sciences

Galina Orlova
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Sergey Medvedev
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Alexander Shevchenko
PhD, Research Institute of Technical Physics and
Automation

Anastasiya Malakhova
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Elena Grigor'eva
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Sofya Pavlova
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Vladlena Makeeva
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Diana Sorogina
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Alexandra Zueva
Novosibirsk State University

Ani Aramyan
Russian-Armenian University

Luisa Iritsyan
Russian-Armenian University

Жукова Ирина Витальевна
Российско-Армянский университет

Irina Zhukova
Russian-Armenian University

Хачатрян Гисане
Российско-Армянский университет, Институт
молекулярной биологии НАН РА

Gisane Khachatryan
Russian-Armenian University, Institute
of Molecular Biology NAS RA

Гукасян Лилит
Институт молекулярной биологии НАН РА

Lilit Ghukasyan
Institute of Molecular Biology NAS RA

Карапетыан Лана Валерьевна
Российско-Армянский университет

Lana Karapetyan
Russian-Armenian University

Барегамян Ева Варужановна
Российско-Армянский университет, Институт
молекулярной биологии НАН РА

Yeva Bareghamyan
Russian-Armenian University, Institute
of Molecular Biology NAS RA

Давитавян Сурен Самвелович
к.б.н., Институт молекулярной биологии НАН РА

Suren Davitavyan
PhD, Institute of Molecular Biology NAS RA

Айрапетян Вардуи Оганесовна
к.б.н., Российско-Армянский университет,
Институт молекулярной биологии НАН РА

Varduhi Hayrapetyan
PhD, Russian-Armenian University, Institute
of Molecular Biology NAS RA

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ / PROGRAM COMMITTEE

Председатели / Chairs

Закиян Сурен Минасович
д.б.н., профессор, Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Suren Zakian
D.Sci., Prof., Institute of Cytology and Genetics, Siberian
Branch of the Russian Academy of Sciences

Аракелян Арсен Арташесович
д.б.н., Институт биомедицины и фармации РАУ,
Институт молекулярной биологии НАН РА

Arsen Arakelyan
Institute of Biomedicine and Pharmacy RAU, Institute
of Molecular Biology NAS RA

Члены Программного комитета / Members of the Program Committee

Сергей Петрович Медведев
к.б.н., Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН

Sergey Medvedev
PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences

Шевченко Александр Игоревич
к.б.н., Научно-исследовательский институт
технической физики и автоматизации

Alexander Shevchenko
PhD, Research Institute of Technical Physics and
Automation

Захарян Роксана Владиславовна
к.б.н., Институт биомедицины и фармации РАУ

Roksana Zakharyan
PhD, Institute of Biomedicine and Pharmacy, Russian-
Armenian University

Салина Елена Артемовна
чл.-корр. РАН, Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Elena Salina
Corr.-Member of RAS, Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Рубцов Николай Борисович

д.б.н., профессор, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Штокало Дмитрий Николаевич

к.ф.-м.н., «Novel Software Systems»

Дементьева Елена Вячеславовна

к.б.н., Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

Захарова Ирина Сергеевна

к.б.н., Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации

Некрасов Вячеслав Лазаревич

Фонд научно-технологического развития Югры

Гершович Павел Михайлович

к.б.н., биотехнологическая компания BIOCAD

Карпенко Андрей Анатольевич

д.м.н., профессор, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства

Салахутдинов Нариман Фаридович

чл.-корр. РАН, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН

Nikolay Rubtsov

D.Sci., Prof., Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Dmitri Shtokalo

PhD, Novel Software Systems

Elena Dementyeva

PhD, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Irina Zakharova

PhD, Research Institute of Technical Physics and Automation

Vyacheslav Nekrasov

Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra

Pavel Gershovich

PhD, BIOCAD

Andrey Karpenko

D.Sci., Prof., Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency

Nariman Salakhutdinov

Corr.-Member of RAS, N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

BIOCAD — ведущая биотехнологическая компания России, осуществляющая полный цикл разработки, исследований и производства препаратов для лечения онкологических, аутоиммунных и наследственных заболеваний.

Наша миссия — это улучшение и продление жизни людей посредством предоставления эффективных, безопасных и доступных комплексных решений в области лекарственного обеспечения.

Наш приоритет — постоянная работа над инновационными проектами в области разработки и производства лекарств.

R&D платформы

Моноклональные антитела

MabNEXT

Платформа по созданию лекарственных препаратов на основе моноклональных антител



55 продуктов
в портфеле



>40
лабораторий

Малые молекулы

ChemNEXT

Платформа по созданию лекарственных препаратов химической природы



>3000
сотрудников



7 производственных
комплексов

Генная терапия

GeneNEXT

Платформа по созданию in vivo и ex vivo генной терапии

**Подробнее
о компании:**





ФОНД НАУЧНО-
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
РАЗВИТИЯ ЮГРЫ



Фонд научно-технологического развития Югры – институт развития, объединяющий компетенции по созданию инновационной инфраструктуры, поддержке научных команд в регионах, привлечению инвестиций в науку.

Науки о жизни, фундаментальные и прикладные исследования для медицины выступают приоритетными направлениями деятельности Фонда. Совместно с консорциумом «Югра-Ген» Фонд создает Центр высоких биомедицинских технологий в городе Сургуте, включающий шесть лабораторий с оборудованием мирового уровня.

Наша цель - содействие инновационному развитию, формирование современного кадрового потенциала и повышение качества жизни населения.



179
млн руб.

Общий объем финансирования исследований



9

Разработанных биомедицинских технологий



25

Поддержано научных команд



10

Поддержано организаций

Фонд поддерживает сильные команды, расширяет возможности молодым коллективам развивать перспективные исследования.



КОНТАКТЫ

+7 3467 39 39 40

info@f-std.ru

www.f-std.ru

ОБОРУДОВАНИЕ

РАСХОДНЫЕ
МАТЕРИАЛЫ

СЕРВИС



Максим
Медикал

- ✓ Мобильные ПЦР-лаборатории и экспресс-ПЦР
- ✓ Реагенты для молекулярно-биологических исследований и тест-системы
- ✓ Готовые наборы CRISP и услуги по дизайну CRISP-caS наборов
- ✓ Синтез олигонуклеотидов и м-РНК
- ✓ Системы визуализации и спектрального анализа с ИИ



MAX@MAXMEDIKAL.COM
maxmedikal.com

+7 926 386 18 06

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ ORAL PRESENTATIONS

CRISPR-AsCas12a-опосредованное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека <i>В.И. Ахмерова</i>	22
Ранний скрининг миодистрофии Дюшенна/Беккера в эру генной терапии: опыт Санкт-Петербурга <i>А.А. Ацапкина, А.В. Киселев, М.А. Маретина, Ю.П. Милюткина, Ж.Н. Тумасова, А.В. Арутюнян, О.А. Клименкова, И.Б. Соснина, Е.В. Снегова, А.С. Готов, О.С. Готов</i>	23
Направленная модификация внеклеточных везикул МСК для управления дифференцировкой стромальных клеток <i>Н.А. Басалова, М.Н. Карагяур, А.Е. Толстолужинская, М.А. Виговский, Н.И. Калинина, А.Ю. Ефименко</i>	24
Система с глубоким подавлением базальной транскрипции и активацией экспрессии с помощью системы CRISPR-Cas9 <i>П.А. Бобровский, В.А. Манувер, Е.Н. Графская, К.А. Бровина, М.Ю. Серебренникова, Д.Д. Харламбиева, В.Н. Лазарев</i>	25
Функциональная геномика клеточной стрессоустойчивости с использованием CRISPRa <i>И.О. Вележжанинов, Е.С. Белых, Е.Е. Расова, М.М. Тавлеева, А.В. Рыбак, Р. Мханна, А.А. Черных</i>	26
Модификация системы праймированного редактирования с использованием нуклеаз для повышения ее эффективности <i>О.В. Володина, А.Г. Демченко, А.А. Анучина, О.П. Рыжкова, В.А. Ковальская, Е.В. Артемова, А.В. Лавров, С.А. Смирнихина</i>	27
Внеклеточные везикулы разного клеточного происхождения при открытых операциях на сердце <i>А.С. Головкин, А.Д. Акино, И. Исмаил-заде, В.К. Гребенник, А.А. Рубинштейн, И.В. Кудрявцев, Е.К. Зайкова, Д.Б. Самбур, Д.А. Килина, А.О. Маричев, О.В. Калинина, А.Е. Баутин, Я. Вааге, А.А. Костарева</i>	28
Циркулирующие эндотелиальные и тромбоцитарные микровезикулы как критерий оценки целостности эндотелия церебрального микроциркуляторного русла <i>Н.В. Гончарова, Л.Н. Анацкая</i>	29
Моделирование нейродегенеративных заболеваний с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и технологии редактирования CRISPR/Cas9 <i>Е.В. Григорьева, Э.Р. Аллаярова, С.М. Закиян, А.А. Малахова</i>	30
Новые направления в онкотераностике <i>С.М. Деев</i>	31
Клеточные и геномные технологии в исследовании гипертрофической кардиомиопатии <i>Е.В. Дементьева, С.В. Павлова, А.Е. Шульгина, С.М. Закиян</i>	32
Клеточные модели респираторного эпителия для моделирования и разработки терапии муковисцидоза <i>А.Г. Демченко, В.Ю. Табаков, Е.Л. Амелина, С.А. Смирнихина</i>	33
Получение растений <i>Nicotiana benthamiana</i> «вирусных фабрик» с помощью метода VIGE на основе вируса TSWV <i>М.В. Дмитриева, А.В. Полховский, Р.А. Комахин, И.В. Киров</i>	34

Клеточная терапия инсулин-дефицитов на основе ИПСК – β -клеток и полимерной капсулы Е.В. Загайнова, А.В. Кашина, А.С. Каширина, П.С. Ермакова, М.А. Батенькин, С.Э. Чесноков, А.Ю. Богомолова, А.В. Панова, А.А. Барина	35
Стромальные клетки миокарда как модель для исследования молекулярно-клеточных основ врожденных пороков сердца А.М. Злотина, П.М. Докшин, Е.Г. Никитина, А.А. Костарева	36
Создание изогенных линий ИПСК путем редактирования оснований для исследования семейной гиперхолестеринемии А.С. Зуева, А.И. Шевченко, С.П. Медведев, С.М. Закиян, И.С. Захарова	37
Идентификация геномных вариантов морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием психических и когнитивных расстройств М.Н. Карагяур, К.Д. Бозов, О.А. Аверина, А.В. Приймак, О.А. Пермяков, С.С. Джауари, О.О. Григорьева, М.Е. Илларионова, В.С. Савицкий, А.Л. Примак, Е.В. Семина, Д.А. Шелег, П.В. Сергиев, В.С. Попов, Е.А. Нейфельд, Б.Д. Цыганков, В.А. Ткачук	38
Роль HAR, расположенных в гене <i>CNTN6</i> , на ранних этапах развития мозга человека <i>in vitro</i> А.С. Князева, А.М. Юнусова, А.В. Смирнов, Т.А. Шнайдер	39
Роль геномных перестроек в формировании резистентного к АДБАХ фенотипа у <i>Klebsiella pneumoniae</i> Д.Н. Конанов, Т.А. Савинова, С.Н. Ковальчук, А.Л. Архипова, О.А. Райдару, Е.В. Корнеев, Л.С. Федорова, Е.Н. Ильина	40
Скрининг противовоспалительного эффекта генной терапии на мышинной модели псориаза Е.Д. Копылов, Е.В. Пресняков, И.Я. Бозо, Р.В. Деев, А.А. Исаев	41
Системы антивирусной защиты <i>Porphyromonas gingivalis</i> Д.В. Кривонос, А.Д. Проскурин, А.А. Ахмедзянова, Т.А. Савинова, К.А. Микаелян, А.В. Введенский, Д.Н. Конанов, А.В. Лукина-Гронская, В.М. Говорун, Е.Н. Ильина, З.Э. Ревазова, М.О. Царгасова, Е.И. Выборная, В.А. Бризгалова, И.С. Бобр, О.О. Янушевич	42
Системы врожденного иммунитета прокариот: роль в клетках и использование в биотехнологии А.В. Кульбачинский	43
Разработка лечения мышечной дистрофии Дюшенна методом пропуска экзонов 11-12 в гене дистрофина Е.В. Куришакова, О.А. Левченко, И.О. Панчук, К.С. Кочергин-Никитский, О.В. Володина, С.Э. Нагиева, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров	44
Активность PARP1 в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и Паркинсона А.А. Малахова, В.С. Макеева, Н.С. Дырхеева, Э.Р. Аллаярова, А.Ю. Столяров, А.А. Сафонова, Е.В. Григорьева, С.П. Медведев, О.И. Лаврик, С.М. Закиян	45
Создание и совершенствование клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний человека с помощью инструментов направленного редактирования геномов С.П. Медведев, С.М. Закиян	46
Испытание вирусных платформ для доставки CRISPR/Cas в сельскохозяйственные культуры Е.В. Михайлова, Э.А. Хуснутдинов, М.П. Терехов, А.А. Галимова, З.Р. Суфьянова, К.И. Сайфуллина, Л.Р. Хакимова	47
Разработка устройства для пространственной фиксации сердца <i>in vivo</i> А.А. Можаев, Д.С. Сучков, Р.М. Карпов, В.С. Овечкина, В.В. Белоусов	48
Формирование коллагеновых матриц с ориентированной структурой для регенерации роговицы Ю.А. Нащеккина, М.Ю. Сироткина, Е.В. Вырезкова, Д.А. Марков, А.В. Нащеккин, Н.А. Михайлова	49

Применение системы прайм-редактирования геномов для создания релевантных моделей наследственных заболеваний человека на основе изогенных линий ИПСК <i>Е.Р. Никитин, С.В. Павлова, С.М. Закиян, С.П. Медведев</i>	50
Регуляция системы CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК <i>Д.С. Новопашина, Е.С. Горленко, Ф.М. Мещанинов, Л.В. Саковина, О.А. Должикова, М.И. Мещанинова, М.А. Воробьева</i>	51
Использование термогенетических инструментов на основе TRPV1-канала для навязывания ритма сердечных сокращений <i>В.С. Овечкина, С.К. Андрианова, В.В. Белоусов, А.А. Можяев</i>	52
G-квадруплексы суперэнхансеров в регуляции транскрипции <i>Ю.И. Павлова, О.М. Иванова, М.С. Юдин, А.В. Сурдина, Н.А. Баринев, М.Е. Богомякова, С.Д. Орешков, З.О. Шенкарев, В.В. Северов, Д.В. Клинов, В.О. Шендер, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, В.Б. Цветков, А.М. Варижук</i>	53
Использование LLM для поиска распространяющихся микроорганизмов в метагеномных данных <i>Н.С. Попов, В.В. Панова, А.Н. Лукашев, А.И. Манолов</i>	54
Подход на основе машинного обучения для определения эффекта влияния миссенс-мутаций на риск развития наследственной транстиретиновой кардиомиопатии <i>И.А. Пьянков, А.В. Каява, М.В. Успенская, А.А. Костарева</i>	55
Как повысить устойчивость картофеля к PVY? И зачем для этого нужен табак <i>О.Л. Ражина, В.В. Никаноркина, А.С. Сущенко, М.В. Лебедева, В.В. Таранов</i>	56
CRISPRa-опосредованная сверхэкспрессия генов <i>SOD3</i> и <i>GPX3</i> повышает устойчивость клеток HEK293 и HeLa к окислительному стрессу <i>Е.Е. Расова, М.М. Тавлеева, Е.С. Белых, А.В. Рыбак, Л.М. Сенча, И.В. Балалаева, И.О. Вележжанинов</i>	57
От молекулы к лекарству <i>Н.Ф. Салахутдинов</i>	58
Применение иммунохроматографических тест-полосок в системах на основе CRISPR/Cas амплификации для быстрой бесприборной детекции патогенных микроорганизмов <i>И.В. Сафенкова, М.В. Камионская, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев</i>	59
Исследование эффективности генетических конструкций, кодирующих нейротрофические факторы человека, в модели БАС у мышей <i>Ю.К. Слепов, М.Е. Фролова, Н.С. Жунусов, С.А. Кушнир, А.А. Курбатова, А.А. Авраменко, Р.В. Деев, А.А. Исаев</i>	60
Каспаза-2 нокаутные мыши, полученные с помощью системы CRISPR–Cas9 <i>Л.В. Смольянинова, А.Р. Мамедова, О.С. Каримова, Б.В. Скрыбин, О.А. Аверина, В.С. Попов, А.А. Шилова, Б.Д. Животовский, Г.С. Копеева</i>	61
Роль варианта с.1492T>G гена <i>GLUD2</i> в нарушении митохондриальной функции нейрональных производных ИПСК пациента с болезнью Паркинсона <i>Д.А. Сорогина, Е.В. Григорьева, С.М. Закиян, А.А. Малахова</i>	62
Эффективность конструкции на основе AAV при FKRР-ассоциированной миопатии <i>in vivo</i> <i>И. Сорочану, И.А. Яковлев, И.С. Лимаев, А.А. Исаев, Р.В. Деев</i>	63
Активация экспрессии генов БИК-светом в растениях: усовершенствование системы BphP1-QPAS1 с дегроном на основе AsLOV2 <i>Э.С. Суркова, Ю.А. Галимова, Н.В. Баттулина, Д.М. Моторина, Е.С. Омелина</i>	64

Инактивация иммунопротеасомы приводит к снижению эффективности репрограммирования соматических клеток <i>А.С. Цимоха, Д.В. Кригер, А.Н. Томилин</i>	65
Сигнальная ось NKG2D-MICA играет ключевую роль в NK-клеточном ответе на аутологичные фибробластоподобные производные ИПСК <i>Д.К. Шерман, М.Е. Богомякова, Э.А. Кастуева, Е.В. Емец, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i>	66
Новая роль гена <i>CNTN6</i> в раннем развитии коры головного мозга человека <i>Т.А. Шнайдер, А.М. Юнусова, А.С. Князева, С.А. Яковлева, И.Е. Пристяжнюк, П.С. Белокопытова, А.А. Хабарова, А.С. Рыжкова, А.В. Смирнов, О.Л. Серов</i>	67
Flow cytometry as a tool for extracellular vesicles phenotyping in immune diseases <i>A.D. Aquino, I.A. Artemyev, O.V. Kalinina, P.A. Fedotov, A.L. Maslyanskiy, A.S. Golovkin</i>	68
Playing with X-chromosome epigenetics in human primed and naïve pluripotent stem cells <i>Mhd.A. Arssan, A.I. Shevchenko, I.S. Zakharova</i>	69
miRNA and cell free-circulated mitochondrial DNA as potential biomarkers of lung cancer <i>R.I. Bersimbay, O.V. Bulgakova, A.A. Kussainova, A.A. Aripova</i>	70
Efficient genome editing using AsCas12a-VLPs produced with Pol II-transcribed crRNA <i>S.E. Borovikova, M.V. Shepelev, N.A. Kruglova</i>	71
Leveraging CRISPR-Cas9 for neurodegenerative disease research <i>H. Davtyan, J.P. Chadarevian, M. Blurton-Jones</i>	72
Exploring aldehyde chain length selectivity in bacterial luciferases <i>A.A. Deeva, A.K. Lyapina, A.E. Lisitsa, E.V. Nemtseva</i>	73
Wnt/ β -catenin activation attenuates osteogenic differentiation and inflammation in female aortic valve interstitial cells <i>P.M. Docshin, P.D. Kuchur, N.V. Boyarskaya, E.A. Repkin, V.E. Uspenskiy, A.B. Malashicheva</i>	74
Creation of a panel of mammalian cell lines with CRISPR/Cas9 knockout of DNA repair genes <i>N.S. Dyrkheeva, A.L. Zakharenko, I.A. Chernyshova, A.A. Malakhova, S.P. Medvedev, S.M. Zakian, O.I. Lavrik</i>	75
Genome editing: from chromatin dynamics to precision therapeutics <i>D.Y. Guschin, A.G. Bykonya, N.A. Barlev, A.V. Zvyagin</i>	76
Artificial intelligence for predicting chromosomal rearrangements in cancer genomes <i>P.E. Karitskaia, Y.V. Vyatkin</i>	77
Enhancing elite wheat variety adaptability using genome editing <i>A.A. Kiseleva, E.M. Timonova, A.A. Berezhnaya, A.E. Kolozhvari, E.A. Salina</i>	78
Investigation of the glioblastoma stem-like cells resistance mechanisms to auranofin by the genome-wide knockout CRISPR screening <i>M.Yu. Kordyukova, T.K. Bulgakov, O.A. Ivanov, O.M. Kudryashova, G.R. Gazizova, E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, E.K. Shevchenko, V.V. Belousov</i>	79
Can ZEB1 be a prognostic factor for uveal melanoma? <i>O.A. Koval, M.V. Zhilnikova, S.P. Zvereva, M.M. Biryukov, M.N. Balantaeva, D.V. Chernih, O.M. Stanishvskaya, V.V. Atamanov</i>	80
ZNF536 dysfunction in neuronal development: a CRISPR/Cas9-based investigation of schizophrenia risk gene function <i>A.O. Kurishev, D.A. Abashkin, D.S. Karpov, V.E. Golimbet</i>	81
Poly(ADP-ribose) polymerases: role in genome stability and editing <i>O.I. Lavrik</i>	82

Antifibrotic potential of macrophage-derived conditioned media in modulation of the lung fibroblast activity <i>A.A. Maksimova, M.A. Tikhonova, E.Y. Shevela, E.R. Chernykh</i>	83
Targeted insertion of large DNA fragments into mammalian genome with site-specific integrase Bxb1 <i>T.E. Minkovskaya, M.V. Shepelev</i>	84
Analysis of intracellular abnormalities associated with Cohen syndrome in Phoenix cell line with mutations of <i>COH1</i> gene <i>K.N. Morosova, E.V. Kiseleva, A.S. Smirnov, E.R. Wolf, I.E. Pristyazhnyuk</i>	85
Engineering the secretory pathway in Chinese hamster ovary cells: beyond genome knockout <i>N.A. Orlova, Yu.A. Khodak, T.I. Triska, M.V. Sinegubova, D.E. Kolesov, I.I. Vorobiev</i>	86
Development of small neuroprotective molecules for the treatment of Parkinson's disease associated with mutations in the <i>GBA1</i> gene: basic science and business <i>S.N. Pchelina</i>	87
Development of monoclonal AAV producer cell lines for the hemophilia B treatment <i>M.P. Perepelkina, A.V. Fomina, E.V. Vlasova, V.R. Rodichkina, V.A. Markova, K.A. Shaitanova, M.A. Vasyoshenkova, D.I. Malkov, I.A. Shmykova, D. Charmet, A.I. Glagoleva, M.A. Mikenkina, A.V. Prokofyev, P.M. Gershovich</i>	88
Gene therapy for Hemophilia B: Arvenacogene sanparvovec <i>A.V. Prokofyev, A.N. Strelkova, D.O. Rzaev, E.V. Yurlova, K.V. Solovyev, M.N. Ryzhkova, V.A. Stukanev, N.A. Spirina, P.M. Gershovich</i>	89
AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in therapy in a mouse model of 21-hydroxylase deficiency <i>N. Sakr, O.V. Glazova, E.N. Antonova, M.V. Vorontsova, P.Y. Volchkov</i>	90
Wheat target genes for CRISPR/Cas9 editing in the post-genomic era <i>E.A. Salina, A.A. Kiseleva, E.M. Timonova, Yu.V. Laprina, A.V. Kochetov</i>	91
Plasma microRNA profiles in heart transplant recipients with acute rejection: a single-center cohort study <i>D.B. Sambur, D.A. Kilina, E.K. Zaikova, L.O. Korneva, M.A. Osipova, A.A. Kostareva, P.A. Fedotov, A.S. Golovkin, O.V. Kalinina</i>	92
Delivery of complexes based on dendronized thiacalix[4]arenes and small RNAs into HeLa tumor cells <i>A.I. Stanavaya, V.M. Abashkin, I.E. Shiabiev, P.L. Padnya, I.I. Stoikov, D.G. Shcharbin</i>	93
Genome editing for crop improvement <i>S.K. Svitashhev</i>	94
Amphiphilic dendrons as gene nanocarriers: study of cellular uptake <i>M.M. Terehova, J. Qiu, Z.B. Kvacheva, A.G. Poleshko, J.-P. Majoral, D.G. Shcharbin</i>	95
Enhancing transformation and genome editing efficiency of commercial barley cultivars using the <i>GRF4-GIF1</i> chimera <i>E.M. Timonova, A.A. Kiseleva, M.A. Nesterov, A.V. Korotkova, A.V. Kochetov, E.A. Salina</i>	96
Centromeric DNA: the storage of genome "black matter" or determinant of centromere species identity? <i>A.V. Vershinin, E.A. Elisafenko, E.V. Evtushenko</i>	97
Genome engineering of CHO cells by multiplex and sequential CRISPR modification: from apoptosis resistance to the production of afucosylated antibodies <i>I.I. Vorobiev, N.A. Orlova, M.V. Sinegubova, R.R. Shaifutdinov, D.E. Kolesov</i>	98

Plasma cytokines patterns for non-invasive diagnostic of cardiac allograft rejection: a longitudinal biomarker study <i>E.K. Zaikova, L.O. Korneva, M.A. Osipova, D.B. Sambur, A.A. Kostareva, P.A. Fedotov, A.S. Golovkin, O.V. Kalinina</i>	99
How a tumor cell responds to the shutdown of one or several pro-oncogenic microRNAs <i>M.A. Zenkova, S.K. Miroshnichenko, O.A. Patutina</i>	100
Base editors: past, present, future <i>D.O. Zharkov</i>	101

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ POSTERS

Потенциал модифицированных каталитически неактивных эндонуклеаз Cas9 для прижизненной визуализации локусов ДНК <i>Г.А. Абушинова, В.В. Жердева, Л.Г. Малошенок</i>	103
Разработка системы для оценки точности геномного редактирования на основе мутагенеза в гене <i>rpoB Escherichia coli</i> <i>М.М. Аманова, И.П. Вохтанцев, Д.О. Жарков</i>	104
Подбор оптимальной вирус-опосредованной доставки генов в кардиомиоциты человека, полученные из ИПСК условно здорового донора <i>С.К. Андрианова, В.С. Овечкина, В.В. Белоусов, А.А. Можяев</i>	105
Генная терапия гемофилии Б на основе синтетических AAV векторов <i>В.В. Артемьев, С.Г. Феоктистова, О.Н. Митяева, П.Ю. Волчков</i>	106
Церийсодержащий октакальциевый фосфат с люминесцентными свойствами для медицинского применения <i>О.В. Баранов, Ю.О. Зобкова, Н.В. Петракова, А.А. Егоров, А.Ю. Федотов, В.С. Комлев</i>	107
<i>In vitro</i> модель на основе клеток человеческой дефинитивной энтодермы для исследования патогенеза болезни Вильсона–Коновалова <i>М.А. Берестовой, В.Д. Стародубова, Е.В. Карпухина, А.С. Баранова, А.В. Иваненко, А.Г. Шохина</i>	108
Современные подходы к созданию репортерных клеточных линий с помощью CRISPR- направленной вставки трансгена в безопасные и эндогенные локусы <i>А.Г. Быконя, Д.Ю. Гуцин, Н.А. Барлев, А.В. Звягин</i>	109
CD71-опосредованные транспортные системы на основе ферритина для селективной доставки лекарственных препаратов к опухолевым клеткам крови человека <i>Ю.М. Гармаза, Н.В. Гончарова, О.Л. Пашкова, В.К. Гаспарян, А.В. Тамашевский</i>	110
Использование бактериальных аргонавтов для изучения конфликтов транскрипции и репликации <i>Б.К. Годнеева, В.А. Пантелеев, А.В. Кульбачинский, Д.М. Гельфенбейн</i>	111
Получение и анализ клеточных линий MNNG/HOS с нокаутом гена <i>PBOV1</i> с помощью системы CRISPR-Cas9 <i>Е.А. Гук, В.Е. Спангенберг, С.А. Брускин, Л.Г. Малошенок</i>	112
Врач-генетик как связующее звено между пациентом и молекулярной терапией наследственных заболеваний <i>Н.М. Двойнова</i>	113
Нуклеаза Cas12f1 как перспективный инструмент для направленных геномных интеграций <i>А.Д. Золотаренко, В.В. Шептий, С.А. Брускин</i>	114

Использование систем CRISPR-активации для разработки противовирусных препаратов И.В. Карандашов, А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, А.С. Фролова, А.С. Тихонов, В.В. Володин, А.В. Качанов, И.А. Гонтарь, Ю.А. Дуванова, А.Н. Лукашев, Н.Ф. Закирова, А.В. Иванов, В.П. Чуланов, Д.С. Костюшев	115
Оценка экспрессии генов инфламмасомы в индуцированных плюрипотентных клетках Л.В. Карапетян, С.А. Аджемян, А.Г. Арамян, И.В. Жукова, В.О. Айрапетян, Р.В. Захарян, А.А. Аракелян	116
Разработка системы мониторинга изменений редокс-параметров при острой ишемии миокарда на моделях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> Р.М. Карпов, В.С. Овечкина, В.В. Белоусов, А.А. Можаяев	117
Исследование эксцизионной репарации оснований с помощью нокаутных клеточных линий человека Д.В. Ким, Д.О. Жарков	118
Особенности кальциевого гомеостаза у кардиомиоцитов с мутацией <i>FLNC</i> A1186V Е.С. Клименко, Е.Г. Никитина, А.А. Костарева	119
Роль <i>Psm8</i> в поддержании протеостаза в ЭСК мыши Д.В. Кригер, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха	120
Антитела к нейраминидазе против вирусов гриппа А после иммунизации сезонными противогриппозными вакцинами П.А. Кударь, М.В. Сергеева, А.Р. Рекстин, Е.А. Романовская-Романько, В.З. Кривицкая, К.С. Кудря, Э.А. Крылова, М.О. Куряева, М.А. Стукова, Ю.А. Дешева	121
Оценка применения системы CRISPR-Cas9 в комбинации с флуорогенными зондами для клеточного имиджинга Л.Г. Малошенок, Г.А. Абушинова, Абдеева И.А., Васина Е.М., В.В. Жердева	122
Флуоресцентный метод количественной оценки и оптимизации связывания комплексов dCas-gPHK с ДНК Н.Ю. Мамаева, П.Г. Фескин, В.А. Яковлев, А.К. Шайтан	123
Разработка клеточных линий для производства рекомбинантных белков с использованием CRISPR/Cas9-опосредованной активации эндогенных факторов роста В.А. Манувера, П.А. Бобровский, Е.Н. Графская, Д.Д. Харлампиева, В.Н. Лазарев	124
Нокаут гена <i>UBE2A</i> изменяет подвижность и пролиферацию клеток при нейрогенезе Р.В. Миронов, А.О. Кустова, Д.В. Голиусова, М.Е. Богомякова, Е.А. Воловиков, Е.В. Емец, А.Д. Ульянов, Е.В. Кондакова, В.С. Тарабыкин, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова	125
Исследование возможности модуляции SLIT-ROBO сигнального пути для коррекции фиброзно-воспалительных изменений при наследственных заболеваниях миокарда Е.Г. Никитина, А.А. Костарева, А.М. Злотина	126
Модель органоидов на основе мезенхимальных клеток PDGFRa+ легких мыши и бронхоальвеолярных стволовых клеток Ю.А. Новикова, И.А. Говорова, С.Ю. Никиточкина, А.А. Воложинская, Е.А. Воротеляк	127
Влияние агонистов рецепторов PPAR δ на метаболизм кардиомиоцитов, полученных из ИПСК С.В. Павлова, Д.А. Сорогина, А.Е. Шульгина, С.М. Закиян, Е.В. Дементьева	128
Взаимодействие белков-Аргонавтов с тиюфосфатными системами рестрикции- модификации в процессе вирусной инфекции В.А. Пантелеев, Б.К. Годнеева, Д.М. Гельфенбейн, А.В. Кульбачинский	129

Редактирование генов карбоангидраз α -семейства <i>Arabidopsis thaliana</i> при помощи эндонуклеазы Cas9 Н.В. Пермякова, Н.Н. Руденко, Л.К. Игнатова, Е.М. Надеева, Д.В. Ветошкина, М.А. Козулёва, Б.Н. Иванов	130
Различия в гликопротеинах и возможность раннего защитного действия с использованием ЖГВ на основе дрейфовых вариантов вируса гриппа A/H1N1pdm09 Д.С. Петрачкова, И.В. Майорова, А.Р. Рекстин, Д.С. Соколовский, П.А. Кударь, Д.С. Гузенков, Н.В. Копылова, А.С. Трулев, Ю.А. Дешева	131
Создание вектора для синтеза гидовых РНК с суперскрученной плазмиды и его валидация с помощью редактирования CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i> Д.Н. Поздеев, Э.А. Хуснутдинов, М.П. Терехов, Е.В. Михайлова	132
Функциональное значение YAP/TAZ в процессе имплантации мыши с применением 3D-модели эндометрия С.М. Румянцева, А.О. Гайдамака, Е.А. Воротеляк	133
Масс-фотометрия для исследования комплексов системы CRISPR/Cas9 Л.В. Саковина, А.В. Ендуткин, Д.С. Новопашина, Д.О. Жарков	134
Вклад генетических вариантов с высокой значимостью в энергетический метаболизм у пациентов с болезнью Паркинсона А.А. Сафонова, А.А. Малахова, Ю.В. Вяткин, С.М. Закиян	135
Олигонуклеотидные шапероны гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 Ю.И. Светлова, Е.И. Малахова, Ю.И. Павлова, В.В. Северов, Т.С. Ведехина, А.М. Варижук	136
Использование системы аптамер-флуороген для визуализации биоконденсатов SARS-CoV-2 Ю.И. Светлова, Д.А. Широков, Т.С. Ведехина, А.А. Аралов, А.М. Варижук	137
«Норма» как объект теории Е.О. Селло, О.В. Курилова, К.С. Горбунов	138
Линия клеток рака молочной железы, экспрессирующая CD44-GFP, для мониторинга дедифференцировки А.А. Сёмчина, А.Ю. Рыжкова, А.Г. Першина	139
Нарушение митохондриальной функции и изменение метаболомного профиля клеточной линии C2C12 на фоне отсутствия экспрессии гена <i>Flnc</i> К.С. Сухарева, Е.Д. Кессених, Ю.А. Власова, Е.С. Клименко, А.А. Костарева	140
Роль FAPa в регуляции функциональных свойств активированных фибробластов А.Е. Толстолужинская, Н.А. Басалова, М.Н. Карагяур, У.Д. Дьячкова, М.А. Виговский, Д.А. Бутузова, М.А. Кулебякина, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко	141
Генетические и эпигенетические исследования в изучении патогенеза и терапии сахарного диабета 2 типа З.Н. Тонян, А.А. Ткаченко, Ю.А. Насыхова, Ю.А. Барбитов, Я.Н. Ренев, М.М. Данилова, А.А. Михайлова, А.С. Готов	142
Молекулярные последствия CRISPR/Cas9-редактирования дубликации гена <i>STAG2</i> М.И. Тубалова, Г.С. Кокшарова, М.М. Гридина, С. Коста, А. Крепичи, В.С. Фишман	143
Применение системы CRISPR/Cas9 для получения репортерных плазмид и исследование мутагенеза, вызванного 8-оксогуанином, <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> М.С. Чуприкова, А.В. Юдкина, Д.О. Жарков	144

Влияние мутации c.7416_7418delGAA в гене <i>FLNC</i> , ассоциированной с рестриктивной кардиомиопатией, на хондрогенную дифференцировку в пациент-специфичной 3D модели хрящевой ткани <i>М.Ю. Шарикова, Д.В. Голиусова, О.С. Лебедева, А.Н. Богомазова</i>	145
Тест-система для детекции хромосомных перестроек с использованием <i>in vitro</i> cleavage assay на основе нуклеазы Cas12a <i>В.В. Шептий, А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин</i>	146
Создание инструментов прайм-редактирования генетического варианта c.2080A>G (p.Met694Val) в гене <i>MEVF</i> ассоциированного с развитием семейной средиземноморской лихорадки <i>А.В. Шубкин, Е.Р. Никитин, Л.В. Карапетян, С.В. Павлова, С.М. Закиян, С.П. Медведев</i>	147
Ингибиторы BET-белков на основе ретроинвертированных пептидов <i>М.С. Юдин, С.Э. Алиева, В.В. Северов, В.Б. Цветков</i>	148
Новые пептидные ингибиторы амилоидизации альфа-синукленина <i>М.С. Юдин, А.М. Варижук, В.А. Манувера, К.А. Бровина, С.Э. Алиева, Н.А. Баринов, Д.Н. Клинов</i>	149
Экспрессия Nef в миелоидных клетках вызывает нарушения функций макрофагов, системное воспаление и спонтанные опухоли у мышей <i>А.С. Яковлева, Е.А. Горшкова, Е.О. Губеранторова, М.И. Букринский, С.А. Недоспасов, М.С. Друцкая</i>	150
Screening of GPI-anchored 2P23 peptide library identified new anti-HIV peptide fusion inhibitors <i>S.E. Borovikova, E.A. Tiukacheva, A.V. Luzhin, S.V. Ulianov, D.V. Mazurov, M.V. Shepelev, N.A. Kruglova</i>	151
Micronuclei levels in doxorubicin- and mitomycin C-treated MRC-5 and HeLa cells with knockdown of the histone <i>H1-5</i> gene <i>T. Harutyunyan, A. Sargsyan, G. Tadevosyan, L. Kalashyan, R. Aroutiounian, G. Hovhannisyan</i>	152
<i>In vitro</i> characterization of a novel type II CRISPR-Cas system KiCas9 <i>M.S. Liashchenko, A.A. Vasileva, D.A. Kretov, M.V. Abramova, T.A. Zair-Bek, M.A. Khodorkovskii, A.N. Arseniev</i>	153
Analysis of a Cas4-like nuclease associated with the Argonaute protein from a mesophilic bacterium <i>L.A. Lisitskaya, M.K. Alieva, V.A. Pantelev, D.M. Gelfenbein, A.V. Kulbachinskiy</i>	154
Transcriptomic analysis of CRISPR-Cas9 knock-in mice with the patient-specific <i>FLNC</i> c.7416_7418delGAA mutation linked to restrictive cardiomyopathy <i>E.A. Lunev, I.I. Galkin, M.Y. Shubina, A.V. Deykin, T.V. Egorova, M.V. Bardina</i>	155
Association between urokinase receptor gene <i>PLAUR</i> polymorphisms and negative symptom subdomains in schizophrenia <i>V.A. Mikhailova, T.V. Lezheiko, V.E. Golimbet, Yu.A. Chaika, E.V. Semina</i>	156
Mitochondrial genome manipulation using a programmable pAgo nuclease <i>B.A. Rimskaya, E.V. Kropocheva, E.I. Shchukina, A.V. Kulbachinskiy, I.O. Mazunin</i>	157

Устные доклады

Oral presentations

CRISPR-AsCas12a-опосредованное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

В.И. Ахмерова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

v.akhmerova@g.nsu.ru

Ключевые слова: AsCas12a; геномное редактирование; индуцированные плюрипотентные клетки

CRISPR-AsCas12a-mediated genome editing of human induced pluripotent stem cells

V.I. Akhmerova

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

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

v.akhmerova@g.nsu.ru

Key words: AsCas12a; genome editing; induced pluripotent stem cells

Для успешного изучения молекулярных механизмов заболеваний человека, поиска и тестирования лекарств необходимы модели, достоверно воспроизводящие патологический фенотип. Одним из перспективных вариантов являются модели основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) с использованием систем редактирования генома, которые позволяют воспроизвести множество генетических вариантов. Ранее в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН были получены линии ИПСК, имеющие трансген программируемой нуклеазы AsCas12a под управлением доксициклин-зависимого промотора.

Для редактирования геномов выбран AsCas12a, так как этот фермент обладает высокой специфичностью и подходит для мультиплексного редактирования генов. Однако, по некоторым данным, эффективность внесения разрывов AsCas12a сравнительно низкая и эта программируемая нуклеаза не может вносить разрыв в определенные участки генома, что связывают с плотной упаковкой хроматина в этих районах. В этой работе было показано, что эффективность внесения разрывов нуклеазой AsCas12a в локусы генома, замены в которых, ассоциированы с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями человека (локусы *MYBPC3*, *APOE*, *PSEN1*, *LRRK2* и *PRKN*), сопоставима с эффективностью внесения разрывов нуклеазой SpCas9. Кроме того, было продемонстрировано, что в линии ИПСК человека с трансгенном нуклеазы AsCas12a, успешно происходит AsCas12a-опосредованная гомологичная рекомбинация 3'-области гена *SOX6* с плазмидной донорной конструкцией. Полученные результаты показывают перспективность использования программируемой нуклеазы AsCas12a в качестве инструмента для редактирования геномов ИПСК и последующего получения клеточных моделей различных заболеваний человека.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН, № FWNR-2022-0015.

Ранний скрининг миодистрофии Дюшенна/Беккера в эру генной терапии: опыт Санкт-Петербурга

А.А. Ацапкина^{1*}, А.В. Киселев¹, М.А. Маретина¹, Ю.П. Милюткина¹, Ж.Н. Тумасова¹, А.В. Арутюнян¹, О.А. Клименкова², И.Б. Соснина², Е.В. Снегова², А.С. Глотов¹, О.С. Глотов¹

¹ ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² СПб ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей», Санкт-Петербург, Россия

* agudkova@mail.ru

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера; КФК; ген *DMD*

Early screening of Duchenne/Becker muscular dystrophy in the era of gene therapy: the St. Petersburg experience

A.A. Atsapkina^{1*}, A.V. Kiselev¹, M.A. Maretina¹, Yu.P. Milyutina¹, Zh.N. Tumasova¹, A.V. Arutyunyan¹, O.A. Klimenkova², I.B. Sosnina², E.V. Snegova², A.S. Glotov¹, O.S. Glotov¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg City Consultative and Diagnostic Center for Children, Saint Petersburg, Russia

* agudkova@mail.ru

Key words: Duchenne/Becker muscular dystrophy; CPK; *DMD* gene

Миодистрофия Дюшенна (МДД) и ее более легкая форма – миодистрофия Беккера (МДБ) – это наследственные нервно-мышечные заболевания, вызванные патогенными вариантами в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин. При МДД дистрофин практически отсутствует, что приводит к прогрессирующей мышечной дегенерации, тогда как при МДБ его уровень снижен или белок частично функционален. Обе формы сопровождаются повышением уровней креатинфосфокиназы (КФК) и трансаминаз в крови. Современные методы генной терапии и геномного редактирования, такие как доставка функциональной копии гена (например, препарат Элевидис), экзон-скиппинг и CRISPR-Cas9-коррекция, открывают новые возможности для патогенетического лечения МДД/МДБ, но их эффективность зависит от ранней диагностики. Целью работы является апробация селективного скрининга МДД/МДБ у детей 2-го года жизни в Санкт-Петербурге. На первом этапе измеряется активность КФК кинетическим УФ-методом с НАС-активацией. Пациентам с уровнем КФК > 250 ЕД/л проводится поиск патогенных вариантов в гене *DMD* методом MLPA и CES. По состоянию на 30.06.2025 исследованы 2450 образцов: выявлены 793 случая с повышенной КФК, 4 пациента с патогенными вариантами в гене *DMD* (трем рекомендована терапия Элевидисом). Также выявлены 5 мальчиков с подозрением на другие ННМЗ (мутации в генах: *GYGI*, *TTN*, *CLCN1*, *RYR1*, *PLEC*). Средний возраст обследованных детей составил 12,6±1,4 месяцев. Предварительные данные подтверждают эффективность предложенной модели скрининга для раннего выявления МДД/МДБ. Внедрение таких программ особенно актуально в условиях появления методов геномного редактирования и генной терапии, позволяющих существенно замедлить прогрессирование заболевания при своевременном вмешательстве.

Финансирование: Исследование поддержано Национальной Ассоциацией «Генетика».

Направленная модификация внеклеточных везикул МСК для управления дифференцировкой стромальных клеток

Н.А. Басалова*, М.Н. Карагяур, А.Е. Толстолужинская, М.А. Виговский, Н.И. Калинина, А.Ю. Ефименко

Медицинский научно-образовательный институт, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* basalovana@my.msu.ru

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; микроРНК; редактирование генома; CRISPR/Cas9

Targeted modification of MSC extracellular vesicles to direct stromal cell differentiation

N.A. Basalova*, M.N. Karagyaur, A.E. Tolstoluzhinskaya, M.A. Vigovskiy, N.I. Kalinina, A.Yu. Efimenko

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

* basalovana@my.msu.ru

Key words: extracellular vesicles; microRNA; genome editing; CRISPR/Cas9

Возможность направленно изменять дифференцировку отдельных типов клеток позволяет управлять процессами регенерации. Одним из многообещающих инструментов для этого являются микроРНК (миР), способные напрямую перепрограммировать клетки. *In vivo* основным переносчиком миР служат внеклеточные везикулы (ВВ). Поэтому изменение состава миР во ВВ представляется перспективным подходом к управлению дифференцировкой клеток. Мезенхимные стромальные клетки (МСК), как и секретируемые ими ВВ, являются ключевыми участниками регуляции процессов дифференцировки при регенерации и фиброзе. Из секретомы МСК (АТСС) были выделены ВВ и трансфицированы синтетическими олигонуклеотидами, подавляющими или имитирующими целевые миР. Содержание исследуемых миР изменяли также непосредственно в клетках с использованием химической трансфекции или электропорации, вставки плазмиды, кодирующей миР, и получения линий с подавлением экспрессии миР с помощью CRISPR/Cas9. Эффективность загрузки миР во ВВ и доставка в целевые клетки была оценена на модели TGF β -индуцированной дифференцировки фибробластов.

Мы показали, что каждым из исследуемых методов можно добиться эффективного (не менее чем в два раза) изменения содержания целевой миР в составе ВВ. Однако трансфекция непосредственно ВВ позволяет увеличить количество миР более чем в 100 раз. Редактирование МСК с помощью CRISPR/Cas9 позволяет получить ВВ, целевая миР в которых не детектируется. Наиболее выраженный эффект на дифференцировку фибробластов оказывают ВВ, полученные от клеток после генетической модификации.

Таким образом, возможно управление изменением содержания миР в составе ВВ-МСК с помощью как химических или физических методов, так и генетического редактирования, что позволяет влиять на дифференцировку клеток *in vitro*. Дальнейшие исследования, в том числе *in vivo*, необходимы для определения наиболее успешных подходов к управлению регенерацией тканей.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта № 075-15-2025-487 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Система с глубоким подавлением базальной транскрипции и активацией экспрессии с помощью системы CRISPR-Cas9

П.А. Бобровский*, В.А. Манувера, Е.Н. Графская, К.А. Бровина, М.Ю. Серебренникова, Д.Д. Харлампиева, В.Н. Лазарев

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

* *pbobrovskiy@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-Cas9; транскрипция; терминатор; экспрессия

Expression system with deep transcriptional repression and CRISPR-Cas9-mediated activation

P.A. Bobrovsky*, V.A. Manuvera, E.N. Grafkskaia, D.D. Kharlampieva, K.A. Brovina, M.Y. Serebrennikova, V.N. Lazarev

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

* *pbobrovskiy@gmail.com*

Key words: CRISPR-Cas9; transcription; terminator; expression

Проблема экспрессии генов, кодирующих токсичные белки в бактериальных системах, давно волнует научное сообщество – даже минимальная базальная экспрессия таких генов может приводить к ингибированию роста клеток или их гибели. Традиционные подходы, включающие использование усиленных промоторов, дополнительных репрессорных систем или плазмид с регулируемой копийностью, не обеспечивают необходимого уровня репрессии базальной транскрипции. В рамках данного проекта была разработана альтернативная стратегия, основанная на регуляции длины транскрипта. В 5'-нетранслируемую область целевого гена встроены терминаторы транскрипции, приводящие к преждевременной терминации и образованию нефункциональных РНК. Ключевой особенностью метода является использование CRISPR-Cas9 для точного вырезания терминаторной последовательности, что позволяет восстановить экспрессию целевого гена. Наиболее эффективным оказалось применение двойного терминатора, сочетающего элементы терминатора гена *rrnB* *E. coli* и модифицированного терминатора T7. В ходе многоэтапного экспериментального исследования система была сначала апробирована на модели eGFP. Мы показали отсутствие накопления флуоресцентного белка при наличии в среде индуктора экспрессии. Были оптимизированы параметры редактирования плазмид, и в заключение успешно протестирована на четырех различных антимикробных пептидах с выраженной бактерицидной активностью. Разработанная платформа открывает новые возможности для контролируемой экспрессии высокотоксичных белков в бактериальных системах с потенциальным применением в биотехнологии и фармацевтике.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, № 23-15-00084, <https://rscf.ru/project/23-15-00084/>.

Функциональная геномика клеточной стрессоустойчивости с использованием CRISPRa

И.О. Велегжанинов^{1, 2*}, Е.С. Белых¹, Е.Е. Расова¹, М.М. Тавлеева¹, А.В. Рыбак¹, Р. Мханна², А.А. Черных¹

¹ Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

* vellio@yandex.ru

Ключевые слова: клеточная стрессоустойчивость; транскрипционное программирование; CRISPRa

Functional genomics of cellular stress resistance using CRISPRa

I.O. Velezhaninov^{1, 2*}, E.S. Belykh¹, E.E. Rasova¹, M.M. Tavleeva¹, A.V. Rybak¹, R. Mhanna², A.A. Chernykh¹

¹ Institute of Biology FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

² ITMO University, St. Petersburg, Russia

* vellio@yandex.ru

Key words: cellular stress resistance; transcriptional programming; CRISPRa

Функциональная геномика человека – это огромная по своему объему область современной биологии. Однако применение ее знаний для управления сложным фенотипом чрезвычайно ограничено. В том числе это касается управления клеточной устойчивости к генотоксическому и окислительному стрессу. Причинами этого, среди прочих, является недостаток экспериментальных данных следующего рода: а) эффектов одновременной сверхэкспрессии или подавления комбинаций функционально взаимосвязанных генов, б) эффектов сверхэкспрессии или подавления одних и тех же генов в различной степени, в) функциональных различий альтернативных транскриптов одних и тех же генов, г) размеченных транскриптомных данных для эффективного машинного обучения.

На основе большого массива сравнительных транскриптомных данных и систематического анализа литературы были найдены перспективные мишени и их функционально комплементарные комбинации с помощью сверхэкспрессии которых можно повысить клеточную стрессоустойчивость. Предложен новый механизм формирования радиоустойчивости опухолевых клеток, связанный со сверхэкспрессией противовирусного гена *IFITM1*.

С помощью технологии CRISPRa проведена серия экспериментов по оценке влияния сверхэкспрессии *IFITM1*, а также генов антиоксидантной защиты (*SOD1-3*, *CAT*, *GPX3*), распознавания повреждений геномной (*RPA1*, *XPC*, *RAD23B*) и митохондриальной ДНК (*MUTYH*) на устойчивость клеток НЕК293Т. Показано, что сверхэкспрессия функционально обоснованных комбинаций генов стресс-ответа может приводить к повышению стрессоустойчивости клеток, при том что сверхэкспрессия тех же генов по отдельности не имеет такого эффекта. На примере гена *SOD2* показана зависимость эффектов от дозы сверхэкспрессии. Предложены новые подходы к формированию размеченных транскриптомных данных, с использованием CRISPRa и CRISPRi для более эффективного машинного обучения.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием, № 122040600024-5.

Модификация системы праймированного редактирования с использованием нуклеаз для повышения ее эффективности

О.В. Володина^{1*}, А.Г. Демченко¹, А.А. Анучина^{1,2}, О.П. Рыжкова¹, В.А. Ковальская¹,
Е.В. Артемова¹, А.В. Лавров¹, С.А. Смирнихина¹

¹ ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия

² МФТИ, Долгопрудный, Московская область, Россия

* olgavolodina@med-gen.ru

Ключевые слова: геномное редактирование; праймированное редактирование; генная терапия; муковисцидоз

Modification of prime editing system using nucleases to enhance its efficiency

O.V. Volodina^{1*}, A.G. Demchenko¹, A.A. Anuchina^{1,2}, O.P. Ryzhkova¹, V.A. Kovalskaya¹,
E.V. Artemova¹, A.V. Lavrov¹, S.A. Smirnikhina¹

¹ RCMG, Moscow, Russia

² MIPT, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

* olgavolodina@med-gen.ru

Key words: gene editing; prime editing; gene therapy; cystic fibrosis

Праймированное редактирование (PE) – современная платформа для точного внесения изменений в геном без образования двуцепочечных разрывов ДНК. Ее эффективность может снижаться из-за потери внесенных изменений в процессе удаления выступающих участков ДНК [1]. Для решения этой проблемы мы разработали 12 модифицированных систем PE, соединив редактор PE_{max} с одной из нуклеаз (FEN1, EXO1 или укороченной HEX-N2) через 4- или 16-аминокислотные линкеры.

Дизайн конструкций создавали с помощью PE-Designer, pegLIT и Benchling. Для сборки pegRNA использовали pU6-pegRNA-GG-акцептор, модифицированные редакторы клонировали в pCMV-PE_{max}. Эксперименты проводили на базальных клетках легкого, полученных из ЧИПСК пациентов с муковисцидозом (гомозиготы F508del в гене *CFTR*). Доставку осуществляли липофекцией, эффективность оценивали через 72 часа глубоким таргетным секвенированием. Статистический анализ проводили с использованием теста Данна в программе Graphpad Prism 9.

Наибольшую эффективность показала система редактирования на основе FEN1, связанной с PE_{max} 4-аминокислотным линкером – средний уровень коррекции F508del в гене *CFTR* был в два раза выше, чем при редактировании с помощью стандартной системы PE_{max}. Таким образом, была разработана эффективная модификация праймированного редактирования, перспективная для дальнейшего применения как в исследовательских целях, так и в целях разработки генной терапии на основе геномного редактирования.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Список литературы

1. Chen P.J., Hussmann J.A., Yan J. et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*. 2021;184(22):5635-5652.e29. doi 10.1016/j.cell.2021.09.018

Внеклеточные везикулы разного клеточного происхождения при открытых операциях на сердце

А.С. Головкин^{1*}, А.Д. Акино¹, И. Исмаил-заде¹, В.К. Гребенник¹, А.А. Рубинштейн^{1,2}, И.В. Кудрявцев^{1,2}, Е.К. Зайкова¹, Д.Б. Самбур¹, Д.А. Килина¹, А.О. Маричев¹, О.В. Калинина¹, А.Е. Баутин¹, Я. Вааге³, А.А. Костарева¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины СЗО РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Госпиталь университета Осло, Осло, Норвегия

* golovkin_as@almazovcentre.ru

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; аортокоронарное шунтирование; искусственное кровообращение

Plasma extracellular vesicles of different cell origin in cardiac surgery

A.S. Golovkin^{1*}, A.D. Aquino¹, I. Ismail-zade¹, V.K. Grebennik¹, A.A. Rubinstein^{1,2}, I.V. Kudryavtsev^{1,2}, E.K. Zaikova¹, D.B. Sambur¹, D.A. Kilina¹, A.O. Marichev¹, O.V. Kalinina¹, A.E. Bautin¹, J. Vaage³, A.A. Kostareva¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, RAS, St. Petersburg, Russia

³ Oslo University Hospital, University of Oslo, Oslo, Norway

* golovkin_as@almazovcentre.ru

Key words: extracellular vesicles; coronary artery bypass grafting; on-pump heart surgery; off-pump heart surgery

С целью изучения выраженности раннего иммунного ответа проведено исследование субпопуляции Т- и В-лимфоцитов, цитокинового профиля и плазменных внеклеточных везикулы (ВВ) у пациентов до и после коронарного шунтирования (АКШ) с искусственным кровообращением (ИК, n = 18) и без такового (без ИК, n = 18). Проводили забор периферической крови до и через 24 часа после операции. Оценивали субпопуляционный состав Т- и В-лимфоцитов, проводили фенотипирование ВВ, а также определяли уровень 47 цитокинов. Применение ИК приводило к значительным изменениям в уровнях ВВ, особенно тромбоцитарных (CD62P+), эндотелиальных (CD31+), В-клеточных (CD19+), а также несущих тромбоцитарные и эритроцитарные маркеры (CD41+CD235a+). Уровни ВВ, экспрессирующих молекулы активации тромбоцитов (CD41+CD62P+), снижались через 24 часа после операции в обеих группах. Было показано, что после операции с ИК увеличивается количество ВВ, происходящих из Т-регуляторных клеток (CD73+CD39+). Выявлены корреляции между уровнями ВВ и цитокинами, особенно после ИК (лейкоцитарные ВВ положительно коррелируют друг с другом и с цитокином GRO, но отрицательно – с эндотелиальными ВВ (CD90+, CD31+)); ВВ CD73+ коррелируют с уровнем тромбоцитов и эритроцитарными ВВ (CD235a+). Результаты секвенирования образцов ВВ продемонстрировали различия в спектре транспортируемых микроРНК до и после операции. Выявленные изменения указывают на участие в регуляции иммунного ответа после операции на открытом сердце.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 19-75-20076.

Циркулирующие эндотелиальные и тромбоцитарные микровезикулы как критерий оценки целостности эндотелия церебрального микроциркуляторного русла

Н.В. Гончарова^{1*}, Л.Н. Анацкая²

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь

* ksju2006@gmail.com

Ключевые слова: микровезикулы; эндотелий; церебральная микроангиопатия; проточная цитометрия; фенотип

Circulating endothelial and platelet microvesicles as an assessment criterion of the cerebral microcirculatory bed endothelium integrity

N.V. Goncharova^{1*}, L.N. Anatskaia²

¹ Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

² Republican Research and Clinical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus

* ksju2006@gmail.com

Key words: microvesicles; endothelium; cerebral microangiopathy; flow cytometry; phenotype

Структурно-функциональные изменения внутреннего слоя сосудистой стенки при селективном воздействии на эндотелий лейкоцитов признаны ведущим механизмом прогрессирования церебральной микроангиопатии (ЦМА). Циркулирующие в периферической крови внеклеточные везикулы (ВВ) являются производными мембран апоптотических/активированных клеток и представляют собой гетерогенную популяцию субмикронных частиц от 30 нм до 1000 нм, выступают в качестве аутокринных и паракринных эффекторов межклеточного взаимодействия и могут стать эффективными биологическими маркерами эндотелиального гомеостаза, воспаления, гемокоагуляции, ангиогенеза и тромбоза. Цель работы – изучить субпопуляционный состав и фенотипический профиль пула циркулирующих микровезикул у пациентов с ЦМА. Определено, что у пациентов с ЦМА ($n = 56$) в остром периоде лакунарного инфаркта мозга (ЛИМ) выявляется значимое увеличение относительного содержания тромбоцитарных ВВ с фенотипом $CD41^+CD61^+CD69^+CD62P^+AnnexinV^+$ ($79,15 \pm 1,72\%$, $p = 0,001$) и эндотелиальных ВВ с фенотипом $CD309^+CD144^+CD146^+CD62E^+CD31^+$ ($7,74 \pm 1,19\%$, $p = 0,030$) относительно их уровней у условно здоровых лиц ($65,38 \pm 2,93\%$ и $3,36 \pm 0,65\%$ соответственно). Сделан вывод, что характеристика фенотипического профиля и установление уровней микровезикул эндотелиального и тромбоцитарного происхождения может служить дополнительным критерием оценки целостности эндотелия церебрального микроциркуляторного русла в остром периоде ЛИМ при ЦМА.

Финансирование: Исследование поддержано ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», задание 02.14 «Разработать и внедрить метод персонализированного лечения лакунарных инфарктов при церебральной микроангиопатии».

Моделирование нейродегенеративных заболеваний с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и технологии редактирования CRISPR/Cas9

Е.В. Григорьева^{1*}, Э.Р. Аллаярова^{1,2}, С.М. Закиян¹, А.А. Малахова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* evlena@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; CRISPR/Cas9; ген *SNCA*

Modeling neurodegenerative diseases using induced pluripotent stem cells and CRISPR/Cas9 editing technology

E.V. Grigor'eva^{1*}, E.R. Allayarova^{1,2}, S.M. Zakian¹, A.A. Malakhova¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* evlena@bionet.nsc.ru

Key words: induced pluripotent stem cells; CRISPR/Cas9; SNCA gene

Благодаря открытию феномена репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию и способности плюрипотентных клеток направленно дифференцироваться практически в любой тип клеток, появилась возможность создавать пациент-специфичные клеточные модели заболеваний, ассоциированных с различными патогенными генетическими вариантами. Полученные клеточные платформы позволяют изучать на молекулярно-генетическом уровне ранние патологические процессы, запускающие каскад сигнальных путей, проводить поиск мишеней, модулирующих эти сигнальные пути, а также осуществлять тестирование новых потенциальных лекарственных препаратов. За последние 15 лет в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН был создан биобанк пациент-специфичных ИПСК от больных такими заболеваниями, как болезни Гентингтона, Паркинсона, Альцгеймера, лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17, амиотрофический боковой склероз, спинальная мышечная атрофия, миодистрофия Дюшенна, гипертрофическая кардиомиопатия, семейная средиземноморская лихорадка, семейная гиперхолестеринемия IIa типа и др. Также благодаря технологии CRISPR/Cas9 были созданы трансгенные линии, несущие генетически кодируемые биосенсоры, такие как MitoTimer, биосенсор стресса ЭПР, а также изогенные линии ИПСК со встроенным трансгеном *SNCA* (ИПСК-SNCA).

Известно, что болезнь Паркинсона ассоциируется с генетическими вариантами в различных генах, наиболее распространенными из которых являются *LRRK2*, *GBA1*, *PRKN*, *PINK1*. Ранее было доказано, что некоторые варианты в гене *SNCA* вызывают семейные формы данного заболевания и деменцию с тельцами Леви. В трансгенных ИПСК-SNCA повышается экспрессия синуклеина, что должно приводить к накоплению олигомерных форм и агрегатов синуклеина в клетках, и таким образом, моделировать болезнь Паркинсона. Используя дофаминергические нейроны, полученные из ИПСК-SNCA, возможно изучать ранние патологические процессы при синуклеинопатии.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-15-00224.

Новые направления в онкотераностике

С.М. Деев^{1, 2*}

¹ Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

* biomet@mail.ru

Ключевые слова: противораковые агенты; адресная доставка; иммунотерапия

New trends in oncotheranostics

S.M. Deyev^{1, 2*}

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

² National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

* biomet@mail.ru

Key words: anticancer agents; targeting; immunotherapy

Предложена концепция доставки противоопухолевых препаратов, которая является альтернативой существующим подходам, основанным на эффекте повышенной проницаемости и удержания (EPR). Наш подход основан на усиленном накоплении наноносителей с лекарственным средством в сосудах опухоли с последующим быстрым высвобождением инкапсулированного препарата, что приводит к эффективному проникновению лекарства в целевую ткань.

Селективность доставки терапевтического агента к целевым клеткам важна для снижения общей токсической нагрузки на организм. Мы предложили ряд подходов, основанных на многофункциональных структурах, которые сочетают адресные модули для распознавания опухолевых клеток и агенты для точной диагностики и эффективной терапии рака. Продemonстрирован синергетический эффект комбинированной иммуно- и химиотерапии, основанный на селективной доставке к опухоли соединений, имеющих различный механизм действия.

Для фотодинамической терапии (ФДТ) глубоко залегающих опухолей разработана методология генетически кодируемой биолюминесцентной резонансной передачи энергии (BRET)-активируемой ФДТ, которая объединяет внутренний источник света и фотосенсибилизатор в единой генетической конструкции. С помощью псевдотипированных вирусов ее можно доставлять в опухоли, расположенные на практически неограниченной глубине.

Для улучшения фармакокинетики, увеличения времени пребывания в крови и снижения накопления в почках малых целевых агентов мы предложили слияние адресного полипептида с доменом, связывающим альбумин. Это предотвращает быструю почечную экскрецию и высокую почечную реабсорбцию, что приводит к лучшему нацеливанию на опухоль.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования РФ, № 075-15-2024-536.

Клеточные и геномные технологии в исследовании гипертрофической кардиомиопатии

Е.В. Дементьева*, С.В. Павлова, А.Е. Шульгина, С.М. Закиян

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* *dementyeva@bionet.nsc.ru*

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; система CRISPR/Cas9; варианты с неясным клиническим значением

Cell and genome technologies in studying hypertrophic cardiomyopathy

E.V. Dementyeva*, S.V. Pavlova, A.E. Shulgina, S.M. Zakian

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

* *dementyeva@bionet.nsc.ru*

Key words: hypertrophic cardiomyopathy; induced pluripotent stem cells; CRISPR/Cas9; variants of unknown significance

Несмотря на то что гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний, проблема разработки эффективных методов его терапии так и остается нерешенной. Применение клеточных технологий – получение кардиомиоцитов в результате направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека – открыло новые возможности для выяснения молекулярных патогенетических механизмов, лежащих в основе ГКМП, и поиска мишеней для терапии.

Наряду с клеточными технологиями, при изучении ГКМП все более активно используются методы редактирования нуклеотидных последовательностей, в особенности система CRISPR/Cas9. Совместное применение двух технологий позволяет получать изогенные линии ИПСК, которые различаются наличием и/или отсутствием одного генетического варианта, что дает возможность решать целый ряд научных задач: создавать новые клеточные модели для изучения ГКМП и «здоровые» изогенные контроли, а также выяснять патогенетический вклад вариантов с неясным клиническим значением в развитие ГКМП.

Помимо обзорной части, в докладе будут представлены данные авторов по использованию технологий ИПСК и CRISPR/Cas9 для оценки патогенетического вклада в развитие ГКМП двух вариантов с неясным клиническим значением: p.M659I в гене *MYH7* и p.N515del в гене *MYBPC3*. Было показано, что наличие данных генетических вариантов (как пациент-специфичных, так и внесенных с помощью системы CRISPR/Cas9) приводило к увеличению размера и нарушению энергетического метаболизма кардиомиоцитов по сравнению с изогенным контролем. Кроме того, вариант p.M659I в гене *MYH7* также вызывал изменения в паттерне экспрессии ряда регуляторных и саркомерных генов и увеличение уровня ионов кальция на стадии покоя кардиомиоцитов. Эти результаты свидетельствуют в пользу патогенности исследуемых вариантов.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015 и Российским научным фондом, № 22-15-00271.

Клеточные модели респираторного эпителия для моделирования и разработки терапии муковисцидоза

А.Г. Демченко^{1*}, В.Ю. Табаков¹, Е.Л. Амелина², С.А. Смирнихина¹

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

² НИИ пульмонологии, Москва, Россия

* demchenkoann@yandex.ru

Ключевые слова: ИПСК; легочные органоиды; базальные клетки легкого; муковисцидоз

Cellular models of respiratory epithelium for modelling and developing therapies for cystic fibrosis

A.G. Demchenko^{1*}, V.Y. Tabakov¹, E.L. Amelina², S.A. Smirnikhina¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Pulmonology Research Institute, Moscow, Russia

* demchenkoann@yandex.ru

Key words: iPSCs; lung organoids; airway basal cells; cystic fibrosis

Клеточные модели активно применяются для изучения клеточных процессов, моделирования заболеваний, тестирования лекарств. В рамках муковисцидоза (МВ) клеточные модели необходимы для подбора таргетной терапии пациентам и скрининга новых препаратов. Клеточные модели респираторного эпителия особенно актуальны при МВ, поскольку чаще всего патология со стороны дыхательной системы является наиболее частой причиной летальных исходов.

В работе проводили получение клеточных моделей МВ базальных клеток легкого (БКЛ) и легочных органоидов (ЛО) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с МВ и здоровых доноров по ранее отработанному протоколу [1]. Доставку плазмиды, содержащей ген *GFP* (10 Кб), для подбора эффективных условий проводили методом липофекции (Lipofectamin LTX) и электропорации (Neon). Функциональная активность CFTR-канала (работа которого нарушена при МВ) оценивалась методом форсколин-индуцированного набухания (ФИН) ЛО.

Получены БКЛ от 5 пациентов с МВ и 2 здоровых доноров, ЛО от 7 пациентов с МВ и 3 здоровых доноров. Способ доставки плазмидной конструкции в БКЛ методом липофекции продемонстрировал наилучшую эффективность и воспроизводимость ($23,2 \pm 6,3\%$) в сравнении с электропорацией ($21,3 \pm 15,9\%$). При оценке функциональной активности CFTR-канала в ЛО показано статистически значимое отличие между ЛО от пациентов с МВ и от здоровых доноров ($p < 0,0001$). При воздействии препаратов патогенетической терапии МВ на ЛО от пациентов с МВ наблюдалось восстановление работы CFTR-канала.

Результаты работы демонстрируют возможность применения БКЛ в качестве клеточной модели для разработки генной терапии МВ. ЛО являются 3D-клеточной моделью МВ и позволяют репрезентативно оценивать проводимость CFTR-канала при МВ.

Финансирование: Работа поддержана государственным заданием Министерства образования и науки РФ.

Список литературы

1. Demchenko A., Belova L., Balyasin M. et al. Airway Basal Cells from Human-Induced Pluripotent Stem Cells: A New Frontier in Cystic Fibrosis Research. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1336392. doi 10.3389/fcell.2024.1336392

Получение растений *Nicotiana benthamiana* «вирусных фабрик» с помощью метода VIGE на основе вируса TSWV

М.В. Дмитриева^{1*}, А.В. Полховский¹, Р.А. Комахин², И.В. Киров¹

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

* dmitrievamarina10@yandex.ru

Ключевые слова: биологический мутагенез; VIGE; TSWV; CRISPR-Cas9; DCL

Nicotiana benthamiana “virus factory” obtainment via TSWV-based VIGE

M.V. Dmitrieva^{1*}, A.V. Polkhovsky¹, R.A. Komakhin², I.V. Kirov¹

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

* dmitrievamarina10@yandex.ru

Key words: biological mutagenesis; VIGE; TSWV; CRISPR-Cas9; DCL

Вирус-опосредованное редактирование генов (VIGE) становится еще одним направлением мутагенеза, который позволяет получить растения с точными мутациями, не используя трансгенез («DNA-free»). Также преимуществом VIGE является то, что многие важные сельскохозяйственные растения, неподверженные классической агробактериальной трансформации, могут быть подвержены заражению вирусами. Для облегчения процесса их заражения необходимы специальные растения-посредники с ослабленным противовирусным ответом – «вирусные фабрики», в которых будет проводится наработка вирусных частиц для последующего заражения сельскохозяйственных культур. Ранее вирус пятнистого увядания томатов (TSWV) использовался для бестрансгенной доставки системы CRISPR-Cas9 в растительные клетки и мутагенеза в целевых генах.

В данной работе мы адаптировали вирус-опосредованный мутагенез растений на основе вируса TSWV на примере гена фитоендесатуразы (*NbPDS*) и применили его для таргетного мутагенеза генов дайсер-подобного белка 2 (*NbDCL2*) и дайсер-подобного белка 4 (*NbDCL4*). Для получения растений с мутациями в целевых генах мы использовали *in vitro* регенерацию из системно инфицированных листьев *N. benthamiana*. Секвенирование показало, что более 95% растений-регенерантов несли мутации в 1–4 локусах *PDS*. Для проверки наследования было получено потомство (M_1) с растений, несущих мутации в 2–3 генах *PDS* (M_0). Потомство этих растений дало расщепление по фенотипу зеленых проростков к белым 3:1 и 15:1. Нами были получены растения *N. benthamiana* с нокаутом по генам *DCL2* (эффективность составила 2–48%) и *DCL4* (эффективность составила 3–16%). Кроме того, при регенерации отредактированных тканей нами были получены нокаутные растения-регенеранты по гену *NbDCL2* (эффективность составила 2–98%) и *NbDCL4* (эффективность составила 4–99%). Растения, содержащие мутации в генах *NbDCL2/4*, будут в дальнейшем использоваться для наработки вирусных частиц с целью заражения других видов растений.

Финансирование: Исследование поддержано в рамках Приоритет 2030 (МФТИ, Физтех).

Клеточная терапия инсулин-дефицитов на основе ИПСК – β -клеток и полимерной капсулы

Е.В. Загайнова^{1,2*}, А.В. Кашина², А.С. Каширина², П.С. Ермакова², М.А. Батенькин³,
С.Э. Чесноков³, А.Ю. Богомолова¹, А.В. Панова^{1,4}, А.А. Барина¹

¹ ФНКИЦ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

² Институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, ПИМУ, Нижний Новгород, Россия

³ Институт металлоорганической химии РАН, Нижний Новгород, Россия

⁴ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

* ezagaynova@gmail.com

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); инсулин-дефициты; β -клетки; альгинатные капсулы

Cell therapy of insulin deficiency based on iPSCs – β -cells and polymer capsule

E. Zagaynova^{1,2*}, A. Kashina², A. Kashirina², P. Ermakova², N. Batenkin³, S. Chesnokov³,
A. Bogomolova¹, A. Panova^{1,4}, A. Barinova¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Technologies, Privolzhskiy Medical Research University, Nizhny Novgorod, Russia

³ Institute of Organometallic Chemistry, G.A. Razuvaev Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* ezagaynova@gmail.com

Key words: induced pluripotent stem cells (iPSCs); insulin deficiencies; β -cells; alginate capsules

Цель исследования – разработка высокоэффективной системы на основе дифференцированных из ИПСК β -клеток в иммуноизолирующей капсуле для компенсации инсулин-дефицитов.

К настоящему моменту выбраны четыре линии ИПСК с высокой представленностью маркеров дефинитивной энтодермы для получения инсулин-продуцирующих β -клеток. Подобран протокол дифференцировки, выявлено, что создание гипертонических условий повышает эффективность почти вдвое. Выбрана линия клеток В2М, она способна дифференцироваться в энтодермальном направлении, экспрессирует маркеры дефинитивной энтодермы, снижает иммунный ответ.

Разработана методика формирования альгинатных капсул на основе солей трехвалентных и двухвалентных металлов. Трехвалентные металлы проявляют высокую эффективность в сшивке альгиновой кислоты по сравнению с барием. В *in vitro* тестировании капсулы, с солями трехвалентных металлов, не стабильны в биологических жидкостях и не проходят тест на деформацию осмотическим давлением. Капсулы, с хлоридом бария, успешно прошли тесты на стабильность и устойчивость. Капсулы, с катионами трехвалентных металлов и хлоридом бария, не оказывали цитотоксического эффекта и были безопасны для инкапсуляции. Не наблюдалось адгезии макрофагов к капсулам – отсутствие воспалительной реакции. Островки Лангерганса, в капсулах с хлоридом бария были жизнеспособными и функционально активными.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке междисциплинарного РНФ проекта, № 24-65-00044.

Стромальные клетки миокарда как модель для исследования молекулярно-клеточных основ врожденных пороков сердца

А.М. Злотина*, П.М. Докшин, Е.Г. Никитина, А.А. Костарева

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* anna-zlotina@yandex.ru

Ключевые слова: врожденные пороки сердца; стромальные клетки сердца; SLIT-ROBO сигнальный путь; сигнальный путь Notch; тетрада Фалло

Cardiac stromal cells as a model for investigation of molecular and cellular basis of congenital heart disease

A.M. Zlotina*, P.M. Docshin, E.G. Nikitina, A.A. Kostareva

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

* anna-zlotina@yandex.ru

Key words: congenital heart disease; cardiac stromal cells; SLIT-ROBO signaling pathway; Notch signaling pathway; tetralogy of Fallot

Врожденные пороки сердца (ВПС) представляют наиболее распространенный тип структурных мальформаций, выявляемых при рождении (0,6-1,3% новорожденных). Несмотря на значительный прогресс в области хирургической коррекции и терапевтического лечения таких пациентов, знания об основах патогенеза ВПС остаются ограниченными. В мировой практике и, в частности, в Центре им. В.А. Алмазова используется спектр современных высокотехнологичных методов генетической диагностики ВПС, включая секвенирование целевых панелей генов, экзомное секвенирование, хромосомный микроматричный анализ, FISH и др. Такой комплексный подход позволяет выявлять патогенные варианты в хорошо известных причинных генах, а также описывать новые гены-кандидаты и генотип-фенотип ассоциации. Удобной *in vitro* моделью для функциональных исследований выявленных генетических вариантов и определения вовлеченных сигнальных каскадов служат стромальные клетки сердца. Ранее сотрудниками нашей лаборатории была показана дерегуляция сигнального каскада Notch в мезенхимных клетках сердца (МКС) от пациентов с тяжелым цианотическим пороком – тетрадой Фалло. В настоящем исследовании с использованием МКС от пациента с сочетанным пороком сердца и почек показан функциональный эффект ранее не описанного варианта с.541_542del в гене *ROBO1*, кодирующем рецептор сигнального каскада SLIT-ROBO. Кроме того, впервые в пациент-специфичных и контрольных МКС охарактеризован уровень экспрессии *TEP1* – нового гена-кандидата, отмеченного у пациентов с тетрадой Фалло или атрезией легочной артерии.

Полученные данные еще раз доказывают информативность и релевантность модели стромальных клеток миокарда при изучении молекулярно-клеточных механизмов кардиогенеза и патогенеза врожденных заболеваний сердца.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ, № 24-15-20026 (<https://rscf.ru/project/24-15-20026/>).

Создание изогенных линий ИПСК путем редактирования оснований для исследования семейной гиперхолестеринемии

А.С. Зуева^{1,2*}, А.И. Шевченко¹, С.П. Медведев¹, С.М. Закиян^{1,2}, И.С. Захарова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* a.zueva@g.nsu.ru

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; ИПСК; редактирование оснований; изогенная линия; клеточные модели

Creation of isogenic lines of iPSCs by base editing for the study of familial hypercholesterolemia

A.S. Zueva^{1,2*}, A.I. Shevchenko¹, S.P. Medvedev¹, S.M. Zakian^{1,2}, I.S. Zakharova¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* a.zueva@g.nsu.ru

Key words: familial hypercholesterolemia; iPSCs; cell models; base editing; isogenic cell lines

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – распространенное заболевание, характеризующееся высоким риском атеросклероза и сердечно-сосудистых патологий. Большинство случаев обусловлено мутациями в гене рецептора ЛПНП (LDLR), нарушающими выведение холестерина и ведущими к образованию атеросклеротических бляшек. Эндотелиоциты – ключевые участники атерогенеза, накапливая липопротеины в субэндотелии. Эффективная диагностика и лечение LDLR-зависимой СГХС ограничены. Для решения проблемы необходимы пациент-специфичные модели, отражающие молекулярный патогенез заболевания.

В данной работе впервые создана система изогенных генетически модифицированных ИПСК на основе линии ICGi036-A от пациента-компаундной гетерозиготы с двумя вариантами LDLR: патогенным с.530C>T (p.Ser177Leu) и вероятно патогенным с.1054T>C (p.Cys352Arg).

Для коррекции однонуклеотидных замен использован CRISPR/Cas-опосредованный base editing, минимизирующий нецелевые эффекты. Получены 3 линии ИПСК, включая гомозиготы по «здоровому» (с.530C) и «больному» (с.530T) аллелям, сохраняющие плюрипотентность. Впервые для СГХС созданы эндотелиальные производные изогенных ИПСК.

Ранее нами показано, что эндотелиальные клетки пациентов с СГХС имеют дисфункцию захвата ЛПНП. Производные линии, гомозиготной по с.530C, демонстрируют достоверное восстановление интернализации ЛПНП. В линии с.530T интернализация отсутствует – полная потеря функции LDLR.

Полученная система изогенных линий ИПСК пациентов с СГХС и их эндотелиальных производных может стать платформой для изучения течения патологических процессов на молекулярном уровне, а также оценки эффективности потенциальных фармакологических препаратов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 24-15-00346.

Идентификация геномных вариантов морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием психических и когнитивных расстройств

М.Н. Карагяур*, К.Д. Бозов, О.А. Аверина, А.В. Приймак, О.А. Пермяков, С.С. Джауари, О.О. Григорьева, М.Е. Илларионова, В.С. Савицкий, А.Л. Примак, Е.В. Семина, Д.А. Шелег, П.В. Сергиев, В.С. Попов, Е.А. Нейфельд, Б.Д. Цыганков, В.А. Ткачук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

* *m.karagyaur@mail.ru*

Ключевые слова: психические и когнитивные расстройства; шизофрения; депрессия; геномный вариант; редактирование генома; CRISPR/Cas9; *in vivo* модель

Identification of genomic variants of brain morphogenetic factors associated with the development of mental and cognitive disorders

M.N. Karagyaur*, K.D. Bozov, O.A. Averina, A.V. Priymak, O.A. Permyakov, S.S. Dzhauari, O.O. Grigorieva, M.Ye. Illarionova, V.S. Savitsky, A.L. Primak, E.V. Semina, D.A. Sheleg, P.V. Sergiev, V.S. Popov, E.A. Neyfeld, B.D. Tsygankov, V.A. Tkachuk

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* *m.karagyaur@mail.ru*

Key words: mental and cognitive disorders; schizophrenia; depression; genomic variant; genome editing; CRISPR/Cas9; *in vivo* model

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2022 год, психические расстройства встречаются у 12% населения земного шара. Дисбаланс между возбуждающими и тормозными структурами мозга, в том числе обусловленный генетическими факторами, как предполагается, лежит в основе развития широкого спектра психических и когнитивных нарушений. Для поиска и установления функции морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием когнитивных и психических расстройств в российской популяции, нами была изучена частота встречаемости некоторых геномных вариантов в генах пациентов, страдающих психическими заболеваниями (шизофрения и депрессия), и здоровых доноров [1]. Для установления функциональной значимости геномного варианта rs1243306395 в гене *Plau* нами была получена линия мышей, несущих данный генетический вариант. Мыши Plau-rs1243306395 имеют признаки пограничного типа психических нарушений: шизоидных нарушений личности и/или нарушений аутистического спектра. Полученные данные помогут лучше понять механизмы развития психических заболеваний, а также могут лечь в основу подходов к их молекулярной диагностике, профилактике и лечению.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, № 22-15-00125-П, <https://rscf.ru/project/22-15-00125/>.

Список литературы

1. Karagyaur M., Primak A., Bozov K. et al. Novel missense variants in brain morphogenic genes associated with depression and schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2024;15:1338168

Роль HAR, расположенных в гене *CNTN6*, на ранних этапах развития мозга человека *in vitro*

А.С. Князева^{1,2*}, А.М. Юнусова^{1,2}, А.В. Смирнов², Т.А. Шнайдер^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* an.knyaz.22@gmail.com

Ключевые слова: human accelerated regions; *CNTN6*; церебральные органоиды; ИПСК

Role of HAR located in the *CNTN6* gene during early stages of human brain development *in vitro*

A.S. Knyazeva^{1,2*}, A.M. Yunusova^{1,2}, A.V. Smirnov², T.A. Shnyder^{1,2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

* an.knyaz.22@gmail.com

Key words: human accelerated regions; *CNTN6*; cerebral organoids; iPSC

Human accelerated regions (HAR) – это консервативные у млекопитающих участки ДНК, которые приобрели в ходе эволюции специфические для человека мутации [1]. Большинство HAR функционируют как энхансеры и локализованы в интронных и межгенных областях вблизи генов, важных для развития мозга. Описаны также патогенные генетические варианты в HAR, нарушающие экспрессию генов, ассоциированных с развитием психических расстройств [2]. В числе генов, потенциально регулируемых HAR, рассматривается *CNTN6*. В его интронах обнаружены два HAR, часто пересекающиеся с вариантами пациентов. Важно отметить, что почти все патогенные варианты в локусе *CNTN6* представлены крупными делециями или дупликациями. В связи с этим нами была выдвинута гипотеза о наличии в данном локусе функционально значимых регуляторных элементов. Следовательно, целью нашей работы стало исследование влияния HAR в гене *CNTN6* на процессы морфогенеза и пролиферации нейрональных предшественников человека *in vitro*.

Исследование регуляторного потенциала HAR в гене *CNTN6* выявило энхансерную активность одной последовательности в культуре нейрональных стволовых клеток человека. Для изучения функциональной роли с помощью CRISPR/Cas9 получены линии ИПСК человека, несущие гомозиготные делеции HAR, и дифференцированы в церебральные органоиды (ЦО). Изучение внутренней организации ЦО показало нарушение морфогенеза вследствие делеций HAR. Дальнейший анализ выявил, что наблюдаемые изменения могут быть обусловлены повышенным уровнем апоптоза клеток радиальной глии и снижением их пролиферативной активности. Таким образом, HAR в гене *CNTN6* функционально значимы для регуляции ключевых процессов нейрональной дифференцировки.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ, № 24-24-00447 (<https://rscf.ru/project/24-24-00447/>).

Список литературы

1. Pollard K.S., Salama S.R., King B. et al. Forces shaping the fastest evolving regions in the human genome. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e168
2. Doan R.N., Bae B.I., Cubelos B. et al. Mutations in human accelerated regions disrupt cognition and social behavior. *Cell.* 2016;167(2):341-354.e12

Роль геномных перестроек в формировании резистентного к АДБАХ фенотипа у *Klebsiella pneumoniae*

Д.Н. Конанов*, Т.А. Савинова, С.Н. Ковальчук, А.Л. Архипова, О.А. Райдару, Е.В. Корнеевко, Л.С. Федорова, Е.Н. Ильина

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

* d.konanov@sysbiomed.ru

Ключевые слова: перестройки генома; резистентность бактерий

The role of genome rearrangements in the formation of the ADBAC-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*

D.N. Konanov*, T.A. Savinova, S.N. Kovalchuk, A.L. Arkhipova, O.A. Raidaru, E.V. Korneenko, L.S. Fedorova, E.N. Ilina

Research Institute for System Biology and Medicine of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

* d.konanov@sysbiomed.ru

Key words: genome rearrangements; bacterial resistance

Алкилдиметилбензиламмоний хлорид (АДБАХ) – четвертичное аммониевое соединение (ЧАС), широко используемое в медицине и в быту в качестве дезинфицирующего средства, при этом механизмы микробной устойчивости к АДБАХ изучены слабо. В представленной работе с целью установить возможные генетические детерминанты устойчивости были получены четыре искусственных мутанта штамма *K. pneumoniae* ATCC 700603, резистентность которых была на два порядка больше, чем у дикого типа.

Данные полногеномного секвенирования показали присутствие в трех из четырех мутантов крупных хромосомных участков с повышенной копийностью. Первый из участков длиной 27 Кб и копийностью 4X был обнаружен в двух из четырех мутантов с идентичными границами. Повышенная копийность в данном случае была следствием tandemной амплификации генома, характерной для бактерий, растущих в стрессовых условиях.

Интересней оказалась топология перестройки второго длинного участка с повышенной копийностью. В трех из четырех мутантов этот участок имел одну и ту же правую границу, но различные левые, соответственно длины рекомбинировавших фрагментов составили 126, 130 и 507 Кб. Было установлено, что во всех случаях произошла негомологичная (запрещенная) рекомбинация участка плазмиды pKQPS1 с участком хромосомы, таким образом, копийность хромосомного участка оказалась под контролем плазмидных механизмов контроля копийности и составила около 1.6X, что соответствует среднему числу копий pKQPS1 плазмиды в диком типе. В литературе негомологичный обмен между плазмидой и хромосомой в отсутствие факторов мобильности не описан, поэтому воспроизводимость наблюдаемой рекомбинации в трех мутантах из четырех еще более удивительна.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в стрессовых условиях даже хромосомные гены без видимых факторов мобильности могут передаваться горизонтально по популяции посредством негомологичной перестройки хромосомы с плазмидой.

Финансирование: Работа была выполнена за счет средств субсидий на выполнение ГЗ № 122030900064-9.

Скрининг противовоспалительного эффекта генной терапии на мышинной модели псориаза

Е.Д. Копылов^{1,2*}, Е.В. Пресняков^{1,2}, И.Я. Бозо^{1,2}, Р.В. Деев², А.А. Исаев³

¹ АО «Гистографт», Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека им. академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ ПАО «Артген», Москва, Россия

* evgenijkopylov19540@gmail.com

Ключевые слова: генная терапия; псориаз; воспаление

Screening of the anti-inflammatory effect of gene therapy in a mouse model of psoriasis

E.D. Kopylov^{1,2*}, E.V. Presnyakov^{1,2}, I.Y. Bozo^{1,2}, R.V. Deev², A.A. Isaev³

¹ JSC “Histograft”, Moscow, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

³ Artgen PJSC, Moscow, Russia

* enijkopylov19540@gmail.com

Key words: gene therapy; psoriasis; inflammation

Хроническое воспаление – патогенетическое звено многих заболеваний. Генная терапия, направленная на доставку противовоспалительных цитокинов, представляет перспективный метод коррекции таких процессов. В исследовании оценивали эффективность генетических конструкций, кодирующих IL-1Ra, IL-10 и IL-36RA, на модели псориазоформного воспаления у мышей. Воспаление индуцировали 9-дневным нанесением имиквимод-содержащего крема (62,5 мг/день). Животных (n = 60) разделили на 6 групп (3 опытные и 3 контрольные). За 28 дней до индукции воспаления выполняли подкожное введение AAV-векторов с целевыми генами. Оценку проводили по шкале PASI, гистоморфометрическим показателям (толщина эпидермиса, извитость эпителия) на 5-е и 10-е сутки, а также методами RT-PCR и ИФА для анализа уровня воспалительных цитокинов (IL-1b, TNF-α и др.). Результаты продемонстрировали, что толщина кожи в группе IL-1Ra была достоверно ниже, чем в контроле, и соответствовала здоровым показателям. В группе IL-10 выявлено значимое снижение извитости эпителия. Методами PCR и ИФА достоверных межгрупповых различий не было обнаружено, что может быть связано с ограниченной диффузией вектора в тканях. Для уточнения данных требуется дополнительный анализ образцов из зоны инъекции. Полученные результаты подтверждают терапевтический потенциал генной доставки противовоспалительных цитокинов, но указывают на необходимость оптимизации подхода.

Список литературы

1. Li Q, Liu W, Gao S et al. Application of imiquimod-induced murine psoriasis model in evaluating interleukin-17A antagonist. BMC Immunol. 2021;22(1):11
2. Jabeen M, Boisdard AS, Danoy A et al. Advanced characterization of imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. Pharmaceutics. 2020;12(9):789

Системы антивирусной защиты *Porphyromonas gingivalis*

Д.В. Кривонос^{1,2}, А.Д. Проскурин¹, А.А. Ахмедзянова¹, Т.А. Савинова¹, К.А. Микаелян¹,
А.В. Введенский¹, Д.Н. Конанов¹, А.В. Лукина-Гронская¹, В.М. Говорун¹, Е.Н. Ильина¹,
З.Э. Ревазова³, М.О. Царгасова³, Е.И. Выборная³, В.А. Бризгалова³, И.С. Бобр³, О.О.
Янушевич³

¹ НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», Москва, Россия

* danil01060106@gmail.com

Ключевые слова: бактериофаги; парадонтит; метилирование

Antiviral defense systems in *Porphyromonas gingivalis*

D.V. Krivonos^{1,2}, A.D. Proskurin¹, A.A. Akhmetzyanova¹, T.A. Savinova¹, K.A. Mikaelyan¹,
A.V. Vvedensky¹, D.N. Konanov¹, A.V. Lukina-Gronskaya¹, V.M. Govorun¹, E.N. Ilina¹,
Z.E. Revazova³, M.O. Tsargasova³, E.I. Vybornaya³, V.A. Brizgalova³, I.S. Bobr³, O.O. Yanushevich³

¹ Research Institute for System Biology and Medicine of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian University of Medicine", Moscow, Russia

* danil01060106@gmail.com

Key words: bacteriophages; periodontitis; methylation

Porphyromonas gingivalis – патогенная бактерия, играющая ключевую роль в развитии парадонтита. Особое место локализации данного патогена дает ему своеобразную защиту, снижая локальную доступность и силу воздействия антибиотиков и антимикробных препаратов, что затрудняет применение классических методов лечения бактериальных заболеваний. Перспективным направлением в этой области является применение фаговой терапии. Сами бактериофаги данного патогена изучены достаточно плохо, однако еще менее изучены системы противовирусной защиты.

В результате поиска систем противовирусной защиты были обнаружены системы abortивной инфекции, 5 типов различных систем CRISPR-Cas и системы рестрикции-модификации. Системы рестрикции-модификации являются наиболее распространенные и у этого вида, однако в литературе они ранее никак не охарактеризовывались. В настоящей работе было обнаружено 16 уникальных сайтов модификации, среди которых 12 соответствуют модификации NbmeA, а 4 – 4meC. Сами сайты имеют разный процент метилирования по культуре, что обуславливает различия между штаммами бактерий по уровню метилирования. В данной работе также было проведено сопоставление определенных сайтов метилирования и соответствующих им метилтрансфераз. Также было выявлено, что сами системы рестрикции-модификации способны передаваться посредством горизонтального переноса, это дополнительно повышает вариативность паттерна метилирования.

Финансирование: Исследование поддержано за счет средств ГЗ 122030900064-9.

Системы врожденного иммунитета прокариот: роль в клетках и использование в биотехнологии

А.В. Кульбачинский*

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

* avkulb@yandex.ru

Ключевые слова: прокариотический иммунитет; бактериофаги; сенсоры и эффекторы; белки-аргонавты

Prokaryotic innate immunity systems: cellular functions and applications in biotechnology

A.V. Kulbachinskiy*

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

* avkulb@yandex.ru

Key words: prokaryotic immunity; bacteriophages; sensors and effectors; argonaute proteins

Системы врожденного иммунитета широко распространены у бактерий и архей и играют ключевую роль в защите клеток от вирусов и других чужеродных элементов. За последние годы обнаружены сотни новых систем, которые действуют на разных стадиях инфекции. Несмотря на огромное разнообразие, многие из этих систем действуют по сходным принципам и включают два основных модуля: сенсорный и эффекторный. Сенсоры непосредственно детектируют чужеродные белки или нуклеиновые кислоты, либо реагируют на изменение состояния клетки при инфекции. Эффекторы могут направленно действовать на инфекционный агент либо в целом на инфицированную клетку, останавливая распространение инфекции в популяции. Сенсорный и эффекторный модуль могут сочетаться в разных комбинациях, увеличивая разнообразие систем иммунитета. В докладе рассмотрены основные принципы организации прокариотических иммунных систем и конкретные примеры систем, действие которых основано на олигомеризации эффекторов. Ярким примером таких систем служат белки-аргонавты, узнающие чужеродную ДНК, и ассоциированные с ними эффекторы, которые способны убивать зараженную клетку вместе с вирусом, вызывая abortивную инфекцию. Подобное модульное строение позволяет использовать белки-аргонавты и другие типы иммунных систем для решения широкого спектра практических задач, от детекции целевых молекул до геномного редактирования.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда 22-14-00182-П.

Разработка лечения мышечной дистрофии Дюшенна методом пропуска экзонов 11-12 в гене дистрофина

Е.В. Куршакова*, О.А. Левченко, И.О. Панчук, К.С. Кочергин-Никитский, О.В. Володина, С.Э. Нагиева, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

* *kurshakovalv@mail.ru*

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна; генная терапия; экзон-скиппинг

Development of a treatment for Duchenne muscular dystrophy using exon 11-12 skipping in the dystrophin gene

E.V. Kurshakova*, O.A. Levchenko, I.O. Panchuk, K.S. Kochergin-Nikitsky, O.V. Volodina, S.E. Nagieva, S.A. Smirnikhina, A.V. Lavrov

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

* *kurshakovalv@mail.ru*

Key words: Duchenne muscular dystrophy; genetic therapy; exon-skipping

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – это нервно-мышечное X-сцепленное заболевание, вызываемое патогенными вариантами в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин. Большинство терапевтических подходов разрабатывается для коррекции патогенных вариантов в экзонах 43–55, наиболее частых у пациентов. Однако 1,5 % больных МДД имеют патогенные варианты в экзонах 11 и 12. Препарат микродистрофина Элевидис может приводить к существенным побочным эффектам у пациентов с делециями экзонов 3–17, антисмысловые олигонуклеотиды для экзонов 11–12 не разрабатывают ввиду малого числа пациентов. Целью работы было разработать методы перманентного пропуска экзонов 11 и 12 путем разрушения сайтов сплайсинга с использованием системы CRISPR/Cas9.

Для создания плазмидных конструкций использовали плазмиды с нуклеазами SpCas9 и SaCas9, содержащие подобранные нРНК. 6 полученных векторов были трансфицированы в культуру HEK293T. Эффективность внесения инделов оценивали через 72 часа методом секвенирования по Сенгеру, данные анализировали в программе TIDE. Конструкции с наиболее эффективными нРНК были трансфицированы в культуры миобластов, полученные от пациента с МДД, имеющего делецию экзонов 12–18, и от здорового донора. Эффективность экзон-скиппинга оценивали через 72 часа методом глубокого таргетного секвенирования, для анализа данных RNA-seq использовалась метрика PSI.

В экспериментах на культуре HEK293T отобраны 4 эффективные нРНК (3 – на пропуск экзона 11, 1 – пропуск экзона 12). В культуре клеток пациента с МДД наибольшая эффективность пропуска экзона 11 с учетом эффективности трансфекции составила 30%, в культуре миобластов здорового донора эффективность пропуска экзона 12 составила 35%. В результате работы показана возможность эффективного пропуска экзонов 11 и 12 гена *DMD* методом перманентного разрушения сайтов сплайсинга, что вносит значительный вклад в прогресс разработки лечения МДД для более широкого спектра пациентов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ, № 23-15-0048.

Активность PARP1 в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и Паркинсона

А.А. Малахова^{1*}, В.С. Макеева¹, Н.С. Дырхеева^{1,2}, Э.Р. Аллаярова¹, А.Ю. Столяров¹,
А.А. Сафонова¹, Е.В. Григорьева¹, С.П. Медведев¹, О.И. Лаврик², С.М. Закиан¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

* amal@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: PARP1; клеточные модели; болезнь Гентингтона; болезнь Паркинсона

PARP1 activity in neurons differentiated from iPSCs of patients with Huntington's and Parkinson's disease

A.A. Malakhova^{1*}, V.S. Makeeva¹, N.S. Dyrkheeva^{1,2}, E.R. Allayarova¹, A.Yu. Stolyarov¹,
A.A. Safonova¹, E.V. Grigor'eva¹, S.P. Medvedev¹, O.I. Lavrik², S.M. Zakian¹

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

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

* amal@bionet.nsc.ru

Key words: PARP1; cell models; Huntington's disease; Parkinson's disease

Патогенез нейродегенеративных заболеваний связан с накоплением в нейронах агрегатов белков, стрессом ЭПР, нарушением аутофагии и дисфункцией митохондрий. Повышенный уровень активных форм кислорода ведет к накоплению повреждений в ДНК. PARP1 синтезирует поли(АДФ-рибозу) (PAR) в местах разрывов ДНК, привлекая ферменты репарации. Гиперактивация PARP1 в нейронах при нейродегенеративных расстройствах приводит к избыточному накоплению PAR, вызывая гибель клеток по пути партанатоза.

Проведено исследование активности фермента PARP1 в дофаминергических нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Паркинсона, и в срединных шипиковых нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона. Активность PARP1 в белковых клеточных экстрактах значимо не различалась в нейрональных культурах, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона с разным числом повторов CAG (38, 46 и 77 CAG) в гене *HTT* и здоровых доноров. В то же время эффективность синтеза PAR в живых клетках, оцененная с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, была повышена в нейронах пациентов. В дофаминергических нейронах, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Паркинсона, активность PARP1 была повышена в одной из трех линии клеток с генетическим вариантом p.N370S *GBA1*, а в клетках с генетическим вариантом p.G2019S *LRRK2* активность PARP1 была значительно снижена по сравнению с контролем. Вестерн-блот анализ показал уменьшение или отсутствие PARP1 в белковых экстрактах нейронов p.G2019S *LRRK2*. Изменение активности PARP1 наблюдалось в «зрелых» нейронах, культивировавшихся не менее 2 месяцев в среде для дифференцировки, что подтверждает важность стадии созревания нейронов при моделировании заболеваний *in vitro*.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-15-00224 (<https://rscf.ru/en/project/23-15-00224/>).

Создание и совершенствование клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний человека с помощью инструментов направленного редактирования геномов

С.П. Медведев^{1, 2*}, С.М. Закиан^{1, 2}

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

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

* *medvedev@bionet.nsc.ru*

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания; ИПСК; редактирование геномов; трансгенез

Generation and development of cell models of human neurodegenerative diseases using directed genome editing

S.P. Medvedev^{1, 2*}, S.M. Zakian^{1, 2}

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

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

* *medvedev@bionet.nsc.ru*

Key words: neurodegenerative diseases; iPSCs; genome editing; transgenesis

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция или боковой амиотрофический склероз, обладают крайне большой генетической гетерогенностью. Науче известны сотни генетических вариантов, расположенных в десятках локусов генома, которые ассоциированы с развитием данных патологий или повышают риск их возникновения. Для изучения механизмов патогенеза данных болезней и тестирования перспективных средств терапии необходимо создание модельных систем, которые воспроизводят патологический фенотип на разных уровнях организации живых систем. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека являются инструментом для создания исследовательских платформ, предназначенных для проведения широкого круга экспериментов на релевантных типах клеток, например нейронах различных типов, получаемых при направленной дифференцировке ИПСК. Совмещение технологий получения и дифференцировки ИПСК с современными инструментами направленного редактирования геномов дает новые возможности, которые существенно расширяют перспективы применения клеточных моделей для выяснения роли отдельных генетических вариантов, в том числе вариантов с неопределенным значением, в развитии патологий. Кроме того, использование направленного трансгенеза позволяет получать модели для прижизненного исследования внутриклеточных процессов, таких как функционирование сигнальных каскадов, систем поддержания гомеостаза или функционирования органелл, а также определять относительную концентрацию клинически значимых соединений и метаболитов. В докладе будет представлен опыт создания изогенных и трансгенных клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, а также анализ проблем и перспектив применения различных инструментов редактирования геномов ИПСК человека.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН, № FWNR-2022-0015.

Испытание вирусных платформ для доставки CRISPR/Cas в сельскохозяйственные культуры

Е.В. Михайлова^{1,2,3*}, Э.А. Хуснутдинов¹, М.П. Терехов^{1,2}, А.А. Галимова¹, З.Р. Суфьянова^{1,3}, К.И. Сайфуллина^{1,2}, Л.Р. Хакимова^{1,2}

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

² Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

³ Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

* mikhele@list.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas; VIGE; растительные вирусы; геномное редактирование

Exploring viral platforms for CRISPR/Cas delivery in crops

E.V. Mikhaylova^{1,2,3*}, E.A. Khusnutdinov¹, M.P. Terekhov^{1,2}, A.A. Galimova¹, Z.R. Sufyanova^{1,3}, K.I. Saifullina^{1,2}, L.R. Khakimova^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics UFRS RAS, Ufa, Russia

² Ufa State Petroleum University, Ufa, Russia

³ Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

* mikhele@list.ru

Key words: CRISPR/Cas; VIGE; plant viruses; genome editing

Основными проблемами CRISPR/Cas редактирования сельскохозяйственных культур является отсутствие эффективных протоколов *in vitro* культивирования, а также слабая изученность геномов многих видов. Проведение редактирования *in planta* с использованием векторов на основе растительных вирусов позволило бы существенно ускорить исследования в данной области, а также валидировать функции генов, которые могут быть ответственны за хозяйственно-ценные признаки. Однако для многих культур отсутствуют данные о возможности доставки и экспрессии таких векторов, а также редактирования семенного потомства. Вирусы, передающиеся через семена, обычно имеют малую емкость и не могут экспрессировать белок Cas9 без потери подвижности, что препятствует *in planta* редактированию.

Ген фитоеен десатуразы *PDS* был выбран в качестве модельного для проверки работоспособности конструкций. Гидовые РНК были подобраны для табака, томата, баклажана, перца, свеклы, гороха, пшеницы, и клонированы в векторы на основе вирусов желтой карликовости фасоли (BeYDV), карликовости пшеницы (WDV), бронзовости томата (TSWV) и погрелковости табака (TRV). В первые два вируса, обладающие узким кругом хозяев и ограниченной подвижностью, а также в не передающийся через семена TSWV вирус были дополнительно проклонированы т-РНК подобные структуры (TLS). В вирус TRV, обладающий вместимостью не более 3 т.п.н., был проклонирован ген миниатюрного белка Cas12j2 размером 2,2 т.п.н.

Исследование позволит оценить возможность применения вирусных векторов для редактирования геномов сельскохозяйственных культур.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-10065, <https://rscf.ru/project/24-76-10065/>.

Разработка устройства для пространственной фиксации сердца *in vivo*

А.А. Можаяев^{1,2,3*}, Д.С. Сучков³, Р.М. Карпов¹, В.С. Овечкина^{1,2}, В.В. Белоусов^{1,2,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

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

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

* a.a.mozhaev@gmail.com

Ключевые слова: стабилизация сердца; прижизненная микроскопия; флуоресцентные биосенсоры

Development of a device for spatial fixation of the heart *in vivo*

A.A. Mozhaev^{1,2,3*}, D.S. Suchkov³, R.M. Karpov¹, V.S. Ovechkina^{1,2}, V.V. Belousov^{1,2,3}

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

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

* a.a.mozhaev@gmail.com

Key words: heart stabilization; intravital microscopy; fluorescent biosensors

Визуализация биологических процессов в бьющемся сердце представляет серьезный технологический вызов для современной кардиологии. Механическая активность миокарда создает препятствия для получения качественных изображений при прижизненной микроскопии. Разработка систем стабилизации важна для изучения окислительного стресса, кальциевого обмена и воспалительных реакций при инфаркте миокарда.

Разработано инновационное устройство на основе кольцевых вакуумных присосок для стабильной фиксации бьющегося сердца при конфокальной, двухфотонной и флуоресцентной микроскопии. Монолитная конструкция из биосовместимых полимеров минимизирует воздействие на миокард. Система воздушных каналов позволяет корректировать позицию присоски без демонтажа. Компактные габариты обеспечивают свободу для микрохирургических манипуляций с сосудами и совмещают визуализацию с регистрацией параметров в реальном времени.

Практическое использование показано на модели инфаркта у мышей с экспрессией флуоресцентных биосенсоров в кардиомиоцитах. Однофотонная микроскопия регистрировала флуоресценцию после наложения лигатуры на левую нисходящую артерию. Вакуумный захват обеспечил стабилизацию поверхности миокарда без нарушения микроциркуляции и регистрацию изменений внутриклеточных параметров. Устройство успешно применено для детекции кальциевых волн с помощью биосенсора GCaMP при термогенетической стимуляции ИК лазером.

Результаты подчеркивают перспективность устройства для фундаментальных исследований в кардиологии. Сочетание механической фиксации с возможностью хирургических вмешательств открывает новые возможности изучения патогенетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний на клеточном уровне.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-75-10111 (https://rscf.ru/prjcard_int?23-75-10111).

Формирование коллагеновых матриц с ориентированной структурой для регенерации роговицы

Ю.А. Нащечкина^{1,2*}, М.Ю. Сироткина², Е.В. Вырезкова², Д.А. Марков¹, А.В. Нащечкин¹, Н.А. Михайлова²

¹ ФТИ им. А.Ф. Иоффе, С.-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, С.-Петербург, Россия

*nashchekina.yu@mail.ru

Ключевые слова: коллаген I типа; ориентирование; клетки роговицы; роговица

Formation of collagen scaffolds with an oriented structure for corneal regeneration

Yu.A. Nashchekina^{1,2*}, M.Yu. Sirotkina², E.V. Vyreskova², D.A. Markov¹, A.V. Nashchekin¹, N.A. Mikhailova²

¹ Ioffe Institute, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

*nashchekina.yu@mail.ru

Key words: collagen type I; orientation; corneal cells; cornea

Восстановление повреждений роговицы глаза – это важная и актуальная задача современной регенеративной медицины. В состав роговицы входит строма, основным компонентом которой является коллаген I типа. Одной из важных особенностей структурной организации стромы считается параллельная ориентация коллагеновых волокон, обеспечивающая прозрачность и механическую прочность роговицы. Создание прототипа стромы роговицы позволит увеличить скорость регенерации глубоких повреждений. Целью настоящего исследования является разработка способов формирования ориентированных коллагеновых волокон, имитирующих структурную организацию коллагена в строме роговицы.

Для выполнения поставленной цели из сухожилий крысиных хвостов методом кислотной экстракции был выделен коллаген I типа. Нативность и целостность молекулы белка была подтверждена методом электрофореза и ИК-спектроскопии. Для параллельной ориентации коллагена было использовано два подхода – ориентация под действием электрического поля и под влиянием механических сил. Для реализации первого подхода была сконструирована ячейка, отработаны условия подачи напряжения и время воздействия электрического поля. Действие механических сил было реализовано с помощью метода 3D печати. Выбор концентрации коллагена, диаметра сопла, а также скорости подачи раствора позволило получить параллельно ориентированные коллагеновые структуры. Структурная организация коллагена, сформированного двумя методами, была проанализирована с помощью сканирующей электронной, атомно силовой микроскопией, а также ИК-спектроскопии. В процессе культивирования клеток роговицы на ориентированных структурах была продемонстрирована ориентация клеток вдоль коллагеновых волокон. Полученные структуры представляют собой более биосовместимую матрицу по сравнению с неориентированными матрицами.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (Соглашение No. 21-74-20120-P, <https://rscf.ru/project/21-74-20120/>).

Применение системы прайм-редактирования геномов для создания релевантных моделей наследственных заболеваний человека на основе изогенных линий ИПСК

Е.Р. Никитин^{1,2}, С.В. Павлова^{1,3}, С.М. Закиян^{1,3}, С.П. Медведев^{1,3*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

* medvedev@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: прайм-редактирование; ИПСК; нейродегенерация; *SNCA*; *MAPT*

Application of genome prime editing to create isogenic iPSC-based relevant models of human inherited diseases

E.R. Nikitin^{1,2}, S.V. Pavlova^{1,3}, S.M. Zakian^{1,3}, S.P. Medvedev^{1,3*}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* medvedev@bionet.nsc.ru

Key words: prime editing; iPSCs; neurodegeneration; *SNCA*; *MAPT*

Создание релевантных моделей для изучения заболеваний до сих пор остается актуальной проблемой биомедицины. Получение для исследований образцов тканей или органов пациентов затруднительно, а животные модели часто не способны полностью воспроизвести патологический фенотип, свойственный для человеческих заболеваний. Направленное внесение патогенных генетических вариантов в геномы индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека позволяет не только изучать молекулярные основы патогенеза заболеваний, но и является перспективным инструментом для клеточной терапии. С момента первого применения системы CRISPR/Cas9 для редактирования геномов эта технология претерпела множество модификаций. Одним из значимых открытий в данной области стала разработка системы прайм-редактирования, которая способна с большой точностью и эффективностью вносить целевые модификации в ДНК размером до 80 п.н., теоретически позволяя исправить до 89% известных патогенных вариантов в геноме человека.

В данном исследовании система прайм-редактирования была применена для создания изогенной клеточной модели болезни Паркинсона и таупатий, ассоциированных с патогенными вариантами в генах *SNCA* (с.88G>C и с.157G>A) и *MAPT* (с.14G>T, с.815G>T и с.902C>T). Были созданы плазмидные конструкции для повышения эффективности редактирования, экспрессирующие ngРНК, а также флуоресцентные белки, hMLH1dn и mp53DD. Применение стратегии, основанной на использовании белка-редактора PEmax, совместно с hMLH1dn, mp53DD и сортировки клеток (FACS), позволило добиться высокой эффективности редактирования и выхода целевых клонов на клетках линии HEK293FT и ИПСК человека.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0015.

Регуляция системы CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК

Д.С. Новопашина^{1*}, Е.С. Горленко¹, Ф.М. Мещанинов^{1,2}, Л.В. Саковина^{1,2}, О.А. Должикова¹, М.И. Мещанинова¹, М.А. Воробьева¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* danov@lbio.ru

Ключевые слова: система CRISPR/Cas9; фоторегуляция; аллостерическая регуляция; направляющие РНК

The regulation of CRISPR/Cas9 system on the guide RNA level

D.S. Novopashina^{1*}, E.S. Gorlenko¹, F.M. Meschaninov^{1,2}, L.V. Sakovina^{1,2}, O.A. Dolzhikova¹, M.I. Meschaninova¹, M.A. Vorobyeva¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* danov@lbio.ru

Key words: CRISPR/Cas9 system; photoregulation; allosteric regulation; guide RNA

Создание регулируемых систем CRISPR/Cas, активностью которых можно управлять, является актуальной задачей [1].

Целью нашей работы является создание систем геномного редактирования CRISPR/Cas9, регулируемых на уровне направляющей РНК.

Использовано два подхода к регуляции на уровне направляющих РНК: облучение светом и аллостерическая регуляция. Линейные направляющие РНК содержали фоторасщепляемые линкеры для разрушения РНК путем облучения и отключения системы редактирования в заданный момент [2–4]. Циклические направляющие РНК исходно не активны, после облучения происходит активация системы [5]. Направляющие РНК, содержащие линкеры на основе азобензола, позволяют изменять структуру РНК, активируя или инактивируя систему в зависимости от длины волны облучения. Для аллостерической регуляции в структуру направляющих РНК вводили аптамер к теofilлину. В зависимости от его локализации в РНК можно активировать/деактивировать систему добавлением теofilлина.

Финансирование: Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300656-5 и гранта РНФ № 22-14-00294.

Список литературы

1. Саковина Л.В., Горленко Е.С., Новопашина Д.С. Фоторегулируемые на уровне направляющей РНК системы CRISPR/Cas. *Биофизика*. 2024;69(3):421-431
2. Akhmetova E.A., Vokhtantsev I.P., Meschaninova M.I. et al. Photocleavable Guide RNA for Photocontrolled CRISPR/Cas9 System. *Russ J Bioorg Chem*. 2024;50(4):1314-1324
3. Новопашина Д.С., Ахметова Е.А., Мещанинова М.И. и др. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9, и способ ее получения. Патент РФ 2765159 от 26.08.2020
4. Sakovina L., Vokhtantsev I., Akhmetova E. et al. Photocleavable Guide crRNAs for a Light-Controllable CRISPR/Cas9 System. *Int J Mol Sci*. 2024;25(22):12392
5. Иванская Е.В., Мещанинова М.И., Воробьева М.А. и др. Подход к получению циклических фоторасщепляемых РНК для фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9. *Биоорганическая химия*. 2024;50(5):622-635

Использование термогенетических инструментов на основе TRPV1-канала для навязывания ритма сердечных сокращений

В.С. Овечкина^{1,2*}, С.К. Андрианова^{1,3}, В.В. Белоусов^{1,2,4}, А.А. Можаяев^{1,2,3,4}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

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

³ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

⁴ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

* *Vs_ovechkina@mail.ru*

Ключевые слова: термогенетика; аритмии; TRPV1-канал; AAV-векторы

Using TRPV1 channel-based thermogenetic tools to impose cardiac pacing

V.S. Ovechkina^{1,2*}, S.K. Andrianova^{1,3}, V.V. Belousov^{1,2,4}, A.A. Mozhaev^{1,2,3,4}

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

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

⁴ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

* *Vs_ovechkina@mail.ru*

Key words: thermogenetics; arrhythmias; TRPV1; AAV vectors

Сердечно-сосудистые заболевания, особенно аритмии, остаются основной причиной смертности. Существующие методы, такие как имплантация кардиостимуляторов, имеют ограничения: риск инфекций, тромбозов и необходимость повторных операций. Альтернативой традиционным методам терапии является термогенетика — метод контроля клеточной активности через TRPV1-каналы. В отличие от оптогенетики, основанной на бактериальных светочувствительных белках, термогенетика использует эндогенные человеческие каналы, что минимизирует риск иммунного ответа. Кроме того, она позволяет осуществлять неинвазивную активацию путем программируемого нагрева. Эти особенности делают термогенетику перспективным направлением для разработки новых терапий аритмий.

В работе созданы инструменты на основе канала TRPV1 для контроля сердечного ритма мыши. В *in vitro* экспериментах показано, что активация канала в кардиомиоцитах происходит при температурной стимуляции, а распространение волны возбуждения в монослое клеток наблюдается из места локального нагрева. При проведении *in vivo* экспериментов достигнуто навязывание ритма до 7 Гц при лазерной стимуляции участков сердца. Контрольные измерения подтвердили температурно-зависимый характер активации. В экспериментах *ex vivo* подтверждено, что волна возбуждения возникает именно в месте стимуляции, что исключает спонтанную активность. Полученные данные демонстрируют высокую эффективность и специфичность метода. Результаты свидетельствуют о перспективности термогенетики для трансляции метода в клиническую практику.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-75-10111 (https://rscf.ru/prjcard_int?23-75-10111).

Г-квадруплексы суперэнхансеров в регуляции транскрипции

Ю.И. Павлова^{1*}, О.М. Иванова¹, М.С. Юдин¹, А.В. Сурдина¹, Н.А. Баринов¹, М.Е. Богомякова¹, С.Д. Орешков², З.О. Шенкарев², В.В. Северов¹, Д.В. Клинов¹, В.О. Шендер¹, А.Н. Богомазова¹, М.А. Лагарькова¹, В.Б. Цветков¹, А.М. Варижук¹

¹ Федеральный научно-клинический центр им. Ю.М. Лопухина физико-химической медицины, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

* pavlova.yuiv@gmail.com

Ключевые слова: Г-квадруплексы; суперэнхансеры; BRD4; транскрипция; разделение фаз

Superenhancer G-quadruplexes in transcription regulation

I.I. Pavlova^{1*}, O.M. Ivanova¹, M.S. Iudin¹, A.V. Surdina¹, N.A. Barinov¹, M.E. Bogomiakova¹, S.D. Oreshkov², Z.O. Shenkarev², V.V. Severov¹, D.V. Klinov¹, V.O. Shender¹, A.N. Bogomazova¹, M.A. Lagarkova¹, V.B. Tsvetkov¹, A.M. Varizhuk¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

* pavlova.yuiv@gmail.com

Key words: G-quadruplex; superenhancer; BRD4; transcription regulation; LLPS

Целью работы являлось прояснение роли Г-квадруплексов (G4) суперэнхансеров (SE) в транскрипции и оценка возможности управления SE-зависимой транскрипцией с помощью G4-лигандов. В ходе исследования было показано статистически значимое обогащение SE сайтами G4. Известно, что взаимодействие SE с промоторами реализуется за счет образования биоконденсатов транскрипционных факторов, наиболее значимым из которых является BRD4. Основной сайт связывания BRD4 на SE – ацетилированные N-концевые участки гистонов. Ранее мы показывали, что G4 препятствуют сборке гистонового октамера во фланкирующих участках ДНК, поэтому возник вопрос о способе удержания BRD4 на G4-богатых SE. По результатам полногеномного анализа, количество BRD4 на G4-богатых SE не снижено. Мы исследовали способность G4 напрямую удерживать BRD4 в участках, свободных от ацетилированных нуклеосом, и получили сопоставимые константы связывания BRD4 с G4 и с ацетилированным пептидом из консенсусного сайта связывания. Затем мы изучили влияние известных G4-лигандов (SOP1812 и PDS) на конденсаты BRD4 с G4 и установили способность лигандов ингибировать их образование. Эти данные были частично подтверждены в экспериментах на клеточной линии K-562: обработка клеток G4-лигандами снижала экспрессию генов под контролем G4-богатых SE, причем степень подавления экспрессии генов лигандом коррелировала с количеством G4, имеющих потенциал к стабилизации, в SE. Результаты данной работы могут быть полезны при изучении действия комбинированного действия G4-лигандов с другими терапевтическими соединениями (ингибиторами BRD4 и проч.).

Финансирование: Исследование поддержано РНФ [22-15-00129-П].

Использование LLM для поиска распространяющихся микроорганизмов в метагеномных данных

Н.С. Попов^{1,2*}, В.В. Панова¹, А.Н. Лукашев², А.И. Манолов¹

¹ *НИИ Системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия*

² *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*

* *nikoraisp@gmail.com*

Ключевые слова: Болезнь X; метагеномика; LLM

Application of LLMs for detecting spreading microorganisms in metagenomic data

N.S. Popov^{1,2*}, V.V. Panova¹, A.N. Lukashev², A.I. Manolov¹

¹ *Research Institute for Systems Biology and Medicine (RISBM) of Rosпотребнадзор, Moscow, Russia*

² *Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

* *nikoraisp@gmail.com*

Key words: Disease X; metagenomics; LLM

«Болезнь X» – термин ВОЗ, введенный в 2018 году для обозначения потенциального неизвестного патогена, способного вызвать пандемию. Такой патоген может иметь скрытое течение и не иметь значимой гомологии с известными последовательностями. Языковые модели, обученные на нуклеотидных последовательностях, могут выявлять функциональные и структурные закономерности геномов без выравнивания с известными последовательностями, что особенно полезно для анализа изменчивых или новых данных. В этом исследовании мы применили большие языковые модели (LLM) для мониторинга изменений представленности последовательностей в метагеномных данных до и после начала пандемии COVID-19. Из базы NCBI отобраны метагеномы: препандемический набор до 2019 года и постпандемический с 2020 года, по 367 SRR-запусков в каждом. Нуклеотидные последовательности преобразуются в эмбединги моделью ViraLM – из каждого из 12 слоев трансформера извлекаются векторы и усредняются по токенам. Затем данные обрабатываются методом главных компонент (PCA), после чего их распределение анализируется с помощью разбиения пространства на ячейки и сравнения их заполненности ячеек с помощью теста Колмогорова–Смирнова для выявления различий между двумя датасетами. Метод успешно обнаружил присутствие SARS-CoV-2 в постпандемическом наборе с чувствительностью до 70%.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием «Разработка алгоритмов выявления новых уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипических характеристик *in vitro*», номер 122030900069-4.

Подход на основе машинного обучения для определения эффекта влияния миссенс-мутаций на риск развития наследственной транстиретиновой кардиомиопатии

И.А. Пьянков^{1*}, А.В. Каява², М.В. Успенская¹, А.А. Костарева³

¹Кафедра химической медицины, Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Центр исследований в области клеточной биологии Монпелье, Монпелье, Франция

³Институт молекулярной биологии и генетики, Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

* vanyurankov@gmail.com

Ключевые слова: ATTR; транстиретин; машинное обучение

A machine learning-based approach for determining the impact of missense mutations on the risk of hereditary transthyretin cardiomyopathy

I.A. Pyankov^{1*}, A.V. Kajava², M.V. Uspenskaya¹, A.A. Kostareva³

¹Department of Chemical Medicine, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

²Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, Montpellier, France

³Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

* vanyurankov@gmail.com

Key words: ATTR; transthyretin; machine learning

В настоящий момент имеется большое количество миссенс-мутации, связанных с амилоидозом, а методы ранней диагностики в основном отсутствуют, что подчеркивает необходимость надежного вычислительного подхода *in silico* для прогнозирования наследственных форм амилоидоза по данным секвенирования. Большинство инструментов исследуют последовательность, приводящую к амилоидогенезу. Однако некоторые заболевания вызваны мутациями в амилоидогенных участках, расположенных в структурированных доменах, которые должны развернуться (денатурировать), чтобы произошло формирование амилоида. Для точной идентификации таких регионов необходимо определять как амилоидогенность, так и оценивать влияние мутаций на стабильность белка. Взяв за основу набор мутаций, связанных с наследственной транстиретиновой кардиомиопатией (ATTR), а также выборку мутаций, вероятно, не имеющих отношения к заболеванию. Мы проанализировали их с использованием предсказателей амилоидогенности и стабильности структуры тетрамера. В ходе исследования было выявлено, что предсказатели стабильности последовательно показывали, что мутации, связанные с ATTR, сильнее дестабилизируют структуру TTR, чем мутации, не связанные с ATTR. На основе этих данных нами была разработана модель машинного обучения SDAM-TTR для прогнозирования мутаций, приводящих к развитию ATTR-кардиомиопатии.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20093-П).

Как повысить устойчивость картофеля к PVY?

И зачем для этого нужен табак

О.Л. Разжина^{1*}, В.В. Никаноркина¹, А.С. Сущенко², М.В. Лебедева¹, В.В. Таранов¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия*

² *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

* *Oksana-razhina@yandex.ru*

Ключевые слова: CRISPR-Cas9; *Nicotiana tabacum*; устойчивость к PVY; VPg

How to increase potato resistance to PVY?

And why we need tobacco for it

O.L. Razhina^{1*}, V.V. Nikanorkina¹, A.S. Sushchenko², M.V. Lebedeva¹, V.V. Taranov¹

¹ *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia*

² *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

* *Oksana-razhina@yandex.ru*

Key words: CRISPR-Cas9; *Nicotiana tabacum*; resistant to PVY; VPg

Y-вирус картофеля (PVY) является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний растений семейства *Solanaceae*. Белок VPg ковалентно присоединен к PVY, связывается с eIF4E (фактором инициации трансляции) имитируя кэп-структуру мРНК клетки-хозяина, что позволяет начать синтез вирусных белков в растительной клетке. Модифицируя eIF4E (фактор восприимчивости), можно добиться повышения устойчивости растений к PVY. Одним из широко используемых методов для оценки белок-белковых взаимодействий является дрожжевая двугибридная система (Y2H). Однако на практике, чтобы подтвердить наличие белок-белковых взаимодействий, необходимо провести дополнительные исследования, это связано с различием в физиологии дрожжей и растений. Необходимо создать систему, где результаты о взаимодействии будут более достоверны и позволят провести проверку различных вариантов модифицированного белка непосредственно в растениях.

Цель – предложить алгоритм действий для наиболее эффективной проверки и отбора смоделированных мутаций eIF4E картофеля.

Помимо Y2H необходимо создать модель *in planta*, в которой полученные результаты о взаимодействии будут более достоверными и позволят провести проверку различных вариантов модифицированного белка непосредственно в растениях. *N. tabacum* является модельным объектом, на основе которого может быть создана система *in planta*. Данная система представляет собой растение табака с нокаутом факторов восприимчивости eIF4E1-S и eIFiso4E-T к PVY, что в свою очередь приводит к повышению устойчивости растения к вирусу Y. При дальнейшей трансформации таких растений факторами табака и картофеля, несущих запланированные мутации в факторе 4E, можно судить об эффективности выбранных модификаций в зависимости от результатов заражения PVY.

Результаты: были определены факторы восприимчивости к PVY табаке. Были созданы конструкции для нокаутирования eIF4E1-S и eIFiso4E-T. Было получено растение, содержащее редактирование по 2 генам.

Финансирование: Исследование было выполнено в рамках Государственного задания номер FGUM-2022-0004.

CRISPRa-опосредованная сверхэкспрессия генов *SOD3* и *GPX3* повышает устойчивость клеток HEK293 и HeLa к окислительному стрессу

Е.Е. Расова^{1*}, М.М. Тавлеева¹, Е.С. Белых¹, А.В. Рыбак¹, Л.М. Сенча², И.В. Балалаева², И.О. Велегжанинов¹

¹ *Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия*

² *Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

* *elrasova@mail.ru*

Ключевые слова: CRISPRa; окислительный стресс; клеточная стрессоустойчивость

CRISPRa-mediated overexpression of *SOD3* and *GPX3* genes enhances the resistance of HEK293 and HeLa cells to oxidative stress

E.E. Rasova^{1*}, M.M. Tavleeva¹, E.S. Belykh¹, A.V. Rybak¹, L.M. Sencha², I.V. Balalaeva², I.O. Velegzhaninov¹

¹ *Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

² *National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia*

* *elrasova@mail.ru*

Key words: CRISPRa; oxidative stress; cellular stress resistance

Регуляция клеточной стрессоустойчивости посредством CRISPRa-опосредованной сверхэкспрессии генов антиоксидантной системы является перспективным подходом по преодолению последствий окислительного стресса на клеточном уровне. Целью данного исследования была оценка эффектов одновременной сверхэкспрессии генов *SOD3* и *GPX3* на устойчивость клеток человека HEK293 и HeLa к окислительному стрессу, вызванному ионизирующим излучением и паракватом. Клетки подвергали трансфекции плазмидой, кодирующей белок dCas9 с активатором транскрипции VPН, и плазмидами, кодирующими геновые РНК к промоторам генов *SOD3* и *GPX3*. После облучения или воздействия паракватом оценивали выживаемость клеток с помощью флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах (FMCA), а также скорость миграции и пролиферации клеток на фоне сверхэкспрессии *SOD3* и *GPX3* без воздействия стрессовых факторов. По данным FMCA, после облучения и воздействия паракватом выживаемость клеток HEK293 со сверхэкспрессией *SOD3* (в 843-954 раза относительно базального уровня) и *GPX3* (в 22-36 раз) была достоверно выше в сравнении с контролем. Данный результат был частично воспроизведен на клетках HeLa. Кроме того, одновременное повышение экспрессии *SOD3* и *GPX3* в клетках HEK293 не стимулировало, а в HeLa снижало скорость миграции клеток, а также приводило к снижению уровня пролиферации в обеих культурах. Данные результаты, на наш взгляд, дают оптимистичный прогноз о целесообразности выбора *SOD3* и *GPX3* как эффективных и потенциально безопасных мишеней транскрипционной регуляции клеточной стрессоустойчивости.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание №125020501526-3).

От молекулы к лекарству

Н.Ф. Салахутдинов*

Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

* *anvar@nioch.nsc.ru*

Ключевые слова: медицинская химия; низкомолекулярные препараты

From molecule to drug

N.F. Salakhutdinov*

Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

* *anvar@nioch.nsc.ru*

Key words: medical chemistry; small molecule drugs

В докладе на основе работ Отдела медицинской химии НИОХ СО РАН рассматриваются примеры создания лекарственных агентов в наиболее востребованных терапевтических классах – онкологии, разнообразных вирусных инфекциях, нейродегенеративных заболеваниях.

Во всех перечисленных областях найдены соединения-лидеры большинство которых прошли цикл доклинических испытаний.

Так создан эффективный антипаркинсонический агент Проттремин, успешно прошедший первую фазу клинических испытаний и имеющий разрешение Минздрава РФ на вторую стадию клинических испытаний.

Обнаружен противовирусный агент Камфецин – производное природной камфоры, который обладает не только выдающейся активностью к штамму H1N1 вируса гриппа, но и способен активно ингибировать широкий спектр других штаммов вируса гриппа.

Производное природной усниновой кислоты является эффективным ингибитором Тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1), являющимся важным ферментом системы репарации ДНК, ответственным за лекарственную устойчивость многих злокачественных заболеваний. Совместное использование этого агента и цитостатика кампотецина позволяет надеяться на успех в лечении такого непростого онкозаболевания как рак легкого.

Финансирование: Исследование поддержано Государственным заданием № 1021051703312-0-1.4.1.

Применение иммунохроматографических тест-полосок в системах на основе CRISPR/Cas амплификации для быстрой бесприборной детекции патогенных микроорганизмов

И.В. Сафенкова*, М.В. Камионская, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

* irina.safenkova@gmail.com

Ключевые слова: изотермическая амплификация; иммунохроматографический анализ; биосенсоры

Application of lateral flow test strips in CRISPR/Cas amplification-based systems for rapid equipment free detection of pathogenic microorganisms

I.V. Safenkova*, M.V. Kamionskaya, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* irina.safenkova@gmail.com

Key words: isothermal amplification; lateral flow assay; biosensors

Интенсивное развитие диагностических систем на основе CRISPR/Cas реакций, проходящих при фиксированной температуре и обеспечивающих специфическое распознавание ДНК/РНК мишеней и, как следствие, неспецифическую нуклеазную активность Cas, требует простых быстрых инструментов для детекции продуктов нуклеазной амплификации. Иммунохроматографические тест-полоски (ИХТ), удовлетворяющие данным требованиям, способны занять эту нишу благодаря возможности настроить генерацию сигнала в ответ на нуклеазное разрезание олигонуклеотидного зонда. Цель исследования – разработка эффективных конфигураций ИХТ для аналитических систем на основе CRISPR/Cas амплификации.

В качестве мишеней для ИХТ детекции изучены несколько наиболее перспективных олигонуклеотидных зондов, применяемых в CRISPR/Cas12a реакциях: 1) [FAM]15dT[Bio], 2) ([FAM][HEg]₃)[TREBLER]15dT[Bio], 3) [IgG][FAM]15dT[Bio], где 15dT – тиминный олигонуклеотид, разрезаемый активированным Cas12a, FAM – флуоресцеин, Bio – биотин, HEg – гексаэтиленгликоль, TREBLER – фосфорамидит для тройного ветвления, IgG – иммуноглобулин G. Для каждого из зондов установлена оптимальная конфигурация ИХТ, включающая рецепторы (стрептавидин, антитела к FAM, антитела к IgG) для распознавания меток (Bio, FAM, IgG) на олигонуклеотидных зондах, формат ИХТ (сэндвич, конкуренция) и соотношения рецептор/зонд. Наиболее эффективная конфигурация ИХТ, полученная для зонда № 2 и сэндвич формата, обеспечивала достоверное дифференцирование положительных и отрицательных результатов CRISPR/Cas12a тестирования за 10 минут с чувствительностью, сопоставимой с приборной флуоресцентной детекцией карбоксиродамина. Эффективность ИХТ подтверждена для выявления специфических ДНК маркеров бактериальных фитопатогенов – *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter sepedonicus*.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, грант № 25-16-00246.

Исследование эффективности генетических конструкций, кодирующих нейротрофические факторы человека, в модели БАС у мышей

Ю.К. Слепов^{1,2,4*}, М.Е. Фролова^{1,2}, Н.С. Жунусов³, С.А. Кушнир³, А.А. Курбатова³,
А.А. Авраменко³, Р.В. Деев⁴, А.А. Исаев^{1,2}

¹ ООО «Нейроген Терапи», Москва, Россия

² ООО «Свифтген», Москва, Россия

³ НИУ «БелГУ», Белгород, Россия

⁴ НИИ МЧ им. академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

* slepoviurii@gmail.com

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз; нейротрофические факторы; генная терапия

Investigation of the efficacy of genetic constructs encoding human neurotrophic factors in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

I.K. Slepov^{1,2,4*}, M.E. Frolova^{1,2}, N.S. Zhunusov³, S.A. Kushnir³, A.A. Kurbatova³,
A.A. Avramenko³, R.V. Deev⁴, A.A. Isaev^{1,2}

¹ Neurogene Therapy LLC, Moscow, Russia

² Swiftgen LLC, Moscow, Russia

³ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University», Belgorod, Russia

⁴ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky NRCS, Moscow, Russia

* slepoviurii@gmail.com

Key words: amyotrophic lateral sclerosis; neurotrophic factors; gene therapy

Боковой амиотрофический склероз – одно из самых распространенных и тяжелых заболеваний, характеризующихся дегенерацией двигательных нейронов. Несмотря на значительные достижения в понимании патогенеза, успех методов лечения остается ограниченным. Нейропротективные свойства нейротрофических факторов (НТФ) могут стать универсальным подходом эффективным для всех пациентов с БАС.

60 трансгенных самцов, экспрессирующих укороченную форму белка FUS (1-359), были разделены на 4 группы в зависимости от вводимого вещества: PBS, AAV-EGFP и 2 группы с генетическими конструкциями, кодирующими НТФ человека (система доставки AAV). Введение проводилось субокипитально особям в возрасте 65 дней. Экспрессия НТФ человека была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты исследования показали, что в группах, получивших конструкции с НТФ, продолжительность жизни животных была выше, чем в группах AAV-EGFP и PBS (медианы: 133-138 дней против 123,5 дней в контрольных группах). Аналогичные результаты были обнаружены для продолжительности бессимптомного периода (медианы: 125-128 и 112-120 дней, соответственно). Результаты были подтверждены с использованием взвешенных лог-ранговых тестов, p-value которых был < 0,01. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной эффективности генной терапии на основе НТФ в лечении бокового амиотрофического склероза.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (ФНТП развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-558).

Каспаза-2 нокаутные мыши, полученные с помощью системы CRISPR–Cas9

Л.В. Смольянинова^{1,2*}, А.Р. Мамедова^{1,2}, О.С. Каримова^{1,2}, Б.В. Скрыбин³, О.А. Аверина^{4,5}, В.С. Попов^{1,6}, А.А. Шилова^{1,6}, Б.Д. Животовский^{1,2,7}, Г.С. Копейна^{1,2}

¹ ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models, University of Münster, Münster, Germany

⁴ НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ ИФГ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ ИРМ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁷ Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

* smolyaninovalarisal@gmail.com

Ключевые слова: каспаза-2; делеция; фертильная функция; линия FVB/N; CRISPR-Cas9

Caspase-2 knockout mice generated by using the CRISPR-Cas9 system

L.V. Smolyaninova^{1,2*}, A.R. Mamedova^{1,2}, O.S. Karimova^{1,2}, B.V. Skryabin³, O.A. Averina^{4,5}, V.S. Popov^{1,6}, A.A. Shilova^{1,6}, B.D. Zhivotovsky^{1,2,7}, G.S. Kopeina^{1,2}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

³ Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models, University of Münster, Münster, Germany

⁴ Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

⁵ Institute of Functional Genomics, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

⁶ Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

⁷ Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

* smolyaninovalarisal@gmail.com

Key words: caspase-2; deletion; fertility; inbred mouse strain FVB/N; CRISPR-Cas9

Каспаза-2 принадлежит к семейству цистеиновых протеаз, участвующих в различных типах программированной гибели клеток, таких как апоптоз, пироптоз, некроптоз, ферроптоз и др. Несмотря на то что каспазу-2 относят к про-апоптотическим белкам, показано ее участие в различных не-апоптотических процессах, включая регуляцию клеточного цикла, пролиферацию, дифференцировку и др. Двойственная роль каспазы-2 в процессах гибели и выживания клеток оставляет открытым вопрос о ее физиологической роли в организме.

Для оценки роли каспазы-2 в функционировании организма нами получены две линии мышей, в которые с помощью технологии CRISPR/Cas9 внесены делеции длиной 7 и 20 нуклеотидов в пятый экзон, кодирующий активный центр фермента. Отсутствие экспрессии гена каспазы-2 подтверждено на уровне РНК и белка в различных тканях нокаутных животных. Обе линии нокаутных по каспазе-2 мышей не имели ярко выраженных патологий, кроме существенно сниженной фертильной функции у самок. Установление механизма нарушения этой важной функции у полученных животных поможет понять регуляторные механизмы, зависящие от функционирования каспазы-2 в условиях *in vivo*.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ, № 23-74-30006.

Роль варианта *c.1492T>G* гена *GLUD2* в нарушении митохондриальной функции нейрональных производных ИПСК пациента с болезнью Паркинсона

Д.А. Сорогина*, Е.В. Григорьева, С.М. Закиян, А.А. Малахова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* *d.sorogina@g.nsu.ru*

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; ИПСК; нейрональная дифференцировка; hGDH2

The role of the *GLUD2 c.1492T>G* variant in mitochondrial dysfunction in neuronal derivatives of iPSCs from a Parkinson's disease patient

D.A. Sorogina*, E.V. Grigor'eva, S.M. Zakian, A.A. Malakhova

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

* *d.sorogina@g.nsu.ru*

Key words: Parkinson's disease; iPSCs; neuronal differentiation; hGDH2

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, связанное с мутациями в различных генах. Одним из таких генов может быть ген *GLUD2*, локализованный на X-хромосоме и кодирующий митохондриальный фермент глутаматдегидрогеназу 2. Вариант *c.1492T>G* гена *GLUD2* может быть связан с развитием БП [1], но его роль в патогенезе вызывает дискуссии в научном сообществе.

В данной работе использовались индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные от пациента женского пола с БП, гетерозиготного по варианту *c.1492T>G* гена *GLUD2*. ИПСК были разделены на две группы, отличающиеся активным гомологом X-хромосомы – X1 и X2. В результате направленной дифференцировки ИПСК двух изогенных групп пациента (X1 и X2) и контрольной линии в дофаминергические нейроны были получены релевантные клетки для изучения БП. Полученные культуры клеток характеризовались наличием специфичного маркера TH (тирозингидроксилазы).

С помощью прижизненной конфокальной микроскопии релевантных клеток была проведена оценка активности митохондрий. В культурах дофаминергических нейронов группы X1 наблюдалось сниженное количество активных митохондрий по сравнению с группой X2 и контрольными культурами. С помощью прибора Seahorse (Agilent) была оценена скорость потребления кислорода (OCR) митохондриями, а также резервная дыхательная способность (SRC). В группе X1 наблюдались сниженные показатели базальной и максимальной OCR и SRC по сравнению с группой X2 и контролем.

Таким образом, вариант *c.1492T>G* гена *GLUD2* локализован на активной X-хромосоме в группе линий X1 и ассоциирован со снижением митохондриальной активности и нарушением окислительного фосфорилирования в дофаминергических нейронах, что может быть причиной развития БП.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ, № 23-15-00224.

Список литературы

1. Zhang W., Gong J., Ding L. et al. Functional validation of a human *GLUD2* variant in a murine model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2020;11(10):897

Эффективность конструкции на основе AAV при FKRP-ассоциированной миопатии *in vivo*

И. Сорочану^{1,2*}, И.А. Яковлев¹, И.С. Лимаев², А.А. Исаев³, Р.В. Деев^{2,3}

¹ ООО «Генотаргет», Инновационный центр «Сколково», Москва, Россия

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского» Минобрнауки России, Москва, Россия

³ ПАО «Артген Биотех», Москва, Россия

* ipsorochanu@gmail.com

Ключевые слова: поясно-конечностная мышечная дистрофия R9; FKRP; генная терапия; адено-ассоциированный вирус

In vivo efficacy of AAV-based constructs for FKRP-associated myopathy

I. Sorochanu^{1,2*}, I.A. Yakovlev¹, I.S. Limaev², A.A. Isaev³, R.V. Deev^{2,3}

¹ Genotarget LLC, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

³ Artgen biotech PJSC, Moscow, Russia

* ipsorochanu@gmail.com

Key words: limb-girdle muscular dystrophy R9; FKRP; gene therapy; adeno-associated virus

Поясно-конечностная миодистрофия R9 – аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутацией в гене *FKRP*, кодирующем фукутин-родственный белок. Генная терапия на основе адено-ассоциированного вируса (AAV) способна привести к репарации мутантного гена и восстановлению синтеза белка, опосредованного трансдукцией вектора [1].

В исследовании была разработана конструкция AAV9.FKRP, несущая трансгенный *FKRP*. Эффективность доставки протестирована *in vivo* на мутантных мышцах линии P448L, которым препарат был введен в/в и в/м. В дальнейшем через 30 суток произведены забор биоматериала и гистологическое исследование: иммунофлуоресценция (ИФ) и морфометрия мышечных волокон (МВ).

По результатам ИФ доля трансдуцированных волокон достигла 30% и была сопоставима с таковой у здоровых мышечных. Паттерн распределения в основном сарколеммальный – низкое количество в цитоплазме свидетельствует о неполном восстановлении синтеза *de novo*.

При обзорном окрашивании г/э – тенденция к снижению доли МВ с интернализированными ядрами и некрозом, но сохранение вариабельности размеров и форм.

Более эффективная трансдукция после введения AAV9.FKRP и улучшение гистологических параметров миодистрофии указывают на возможное дальнейшее применение конструкции с увеличением выборки и времени экспозиции препарата в организме мышечных.

Финансирование: Государственное задание «Генно-клеточная регуляция регенерации тканей опорно-двигательного аппарата и разработка лекарственных препаратов на их основе», FURG-2025-0050, 1024100700005-8.

Список литературы

1. Villar Quiles R.N., Richard I., Bouchet-Seraphin C., Stojkovic T. Limb-Girdle Muscular Dystrophy type R9 linked to the FKRP gene: state of the art and therapeutic perspectives. *Med Sci (Paris)*. 2020;36(2):28-33

Активация экспрессии генов БИК-светом в растениях: усовершенствование системы BphP1-QPAS1 с дегроном на основе AsLOV2

Э.С. Суркова^{1,2*}, Ю.А. Галимова¹, Н.В. Баттулина¹, Д.М. Моторина¹, Е.С. Омелина¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* ellina.sur@gmail.com

Ключевые слова: оптогенетика; регуляция транскрипции; экспрессия трансгена; ближний инфракрасный свет (БИК)

Selective NIR-activated gene expression in plants: optimizing BphP1-QPAS1 with an AsLOV2 degon

E.S. Surkova^{1,2*}, Y.A. Galimova¹, N.V. Battulina¹, D.M. Motorina¹, E.S. Omelina¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* ellina.sur@gmail.com

Key words: optogenetics; transcriptional regulation; transgene expression; near-infrared light (NIR)

Для устранения неспецифической активации оптогенетических систем в условиях дневного белого света [1] мы усовершенствовали систему BphP1-QPAS1, активируемую ближним инфракрасным светом (БИК, 780 нм) [2], введя синий свет-чувствительный домен AsLOV2 (460-480 нм).

Активация транскрипции целевого гена происходит за счет димеризации компонентов BphP1 и QPAS1, что приводит к сближению слитых с ними трансактивационного домена VP16 и ДНК-связывающего домена Gal4 соответственно. Для подавления фоновой активации белок QPAS1 был слит с доменом AsLOV2, в котором воздействие синего спектра вызывает экспонирование функциональных последовательностей.

Более успешным оказался подход, в котором AsLOV2 был соединен с дегронной последовательностью RRRG. В этом случае происходила направленная деградация химерного белка QPAS1.

Экспериментальная проверка проводилась на листьях *Nicotiana benthamiana* с использованием репортерного гена pEGFP. Результаты продемонстрировали, что вариант с RRRG-дегроном обеспечивал строго БИК-специфичную активацию экспрессии pEGFP без видимого фонового сигнала при белом свете и в темноте.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ, грант № 22-74-10118-П (<https://rscf.ru/project/22-74-10118/>).

Список литературы

1. Braguy J., Zurbriggen M.D. Synthetic strategies for plant signalling studies: molecular toolbox and orthogonal platforms. *Plant J.* 2016;87(1):118-138
2. Redchuk T.A., Omelina E.S., Chernov K.G., Verkhusha V.V. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. *Nat Chem Biol.* 2017;13(6):633-639

Инактивация иммунопротеасомы приводит к снижению эффективности репрограммирования соматических клеток

А.С. Цимоха*, Д.В. Кригер, А.Н. Томилин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

* *atsimokha@incras.ru*

Ключевые слова: иммунопротеасома; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; репрограммирование

Inactivation of the immunoproteasome leads to reduced efficiency of somatic cell reprogramming

A.S. Tsimokha*, D.V. Kriger, A.N. Tomilin

Institute of Cytology, RAS, Saint-Petersburg, Russia

* *atsimokha@incras.ru*

Key words: immunoproteasome; induced pluripotent stem cells; reprogramming

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют собой перспективную модель как для фундаментальных исследований биологии развития, так и для регенеративной медицины. Подобно эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), иПСК способны к неограниченному самоподдержанию и дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Несмотря на прогресс, эффективность получения и качество иПСК остаются недостаточными, в том числе из-за многофакторности процесса. Молекулярные механизмы индукции плюрипотентности также изучены не полностью.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) деградации белков играет ключевую роль в плюрипотентности и дифференцировке ЭСК и иПСК, обеспечивая поддержание протеостаза. При изменении условий среды (стресс, воспаление, вирусная инфекция) или во время программных перестроек клетки (репрограммирование, дифференцировка) состав протеасомных может меняться. В ряде случаев каталитические субъединицы протеасом замещаются индуцибельными аналогами (Lmp2, Lmp7, Mecl-1), формируя иммунопротеасому. Хотя она изначально была описана как компонент иммунной системы, все больше данных указывает на ее участие в регуляции клеточных состояний. Например, в ЭСК человека выявлена высокая экспрессия иммуносубъединиц, снижающаяся при дифференцировке, что предполагает их роль в поддержании плюрипотентности.

В нашем исследовании показано, что активность иммунопротеасомы критична для репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши в иПСК. Зафиксировано повышение экспрессии иммуносубъединиц на ранних этапах процесса. Ингибирование общей протеасомной активности или селективной активности иммунопротеасомы в этот период значительно уменьшало число сформированных колоний иПСК. Генетическая инактивация иммуносубъединицы Lmp7 также резко снижала эффективность репрограммирования, что подтверждает ключевую роль иммунопротеасомы.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-482 от 29-05-2025).

Сигнальная ось NKG2D-MICA играет ключевую роль в NK-клеточном ответе на аутологичные фибробластоподобные производные ИПСК

Д.К. Шерман*, М.Е. Богомякова, Э.А. Кастуева, Е.В. Емец, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова
Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина,

ФМБА, Россия, Москва

* dar.sher.man0@gmail.com

Key words: иммуногенность; аутологичный NK-клеточный ответ; производные ИПСК

NKG2D-MICA axis plays the pivotal role in NK-cell response to autologous fibroblast-like iPSC derivatives

D.K. Sherman*, M.E. Bogomiakova, E.A. Kastueva, E.V. Emets, A.N. Bogomazova, M.A. Lagarkova

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russia

* dar.sher.man0@gmail.com

Key words: immunogenicity; autologous NK-cell response; iPSC derivatives

Клеточная терапия на основе аутологичных производных ИПСК в теории не предполагает использования иммуносупрессивных препаратов, однако иммуногенные свойства дифференцированных производных ИПСК остаются не до конца изученными. Ранее было показано, что фибробластоподобные производные ИПСК (iPS-fibro) вызывают цитотоксический ответ аутологичных NK-клеток вследствие пониженной экспрессии ингибирующих лигандов, прежде всего HLA класса I, и повышенной экспрессии активирующих лигандов, включая MICA (взаимодействующую с NK-клеточным рецептором NKG2D), PVR и NECTIN2 (лиганды для NK-клеточного рецептора DNAM-1). Настоящее исследование посвящено определению вклада каждого из активирующих лигандов в активацию NK-клеток.

С помощью CRISPR/Cas9-редактирования были созданы iPS-fibro с нокаутом *NECTIN2*, *PVR* или *MICA* с последующей оценкой цитотоксического ответа NK-клеток по дегрануляции, определяемой по уровню экспрессии маркера дегрануляции CD107a.

В ходе иммунных тестов было показано, что блокирование рецептора DNAM-1 на поверхности NK-клеток не оказало существенного влияния на цитотоксический ответ NK-клеток на iPS-fibro. Нокаут *PVR* имел донор-специфичный характер, и поэтому такая стратегия не может быть использована для создания гипои иммуногенных клеток. Интересно, что отсутствие *NECTIN2* повышало иммуногенность iPS-fibro, что указывает на возможную ингибирующую функцию *NECTIN2* через взаимодействие с NK-клеточными рецепторами TIGIT или PVRIG.

Напротив, ингибирование рецептора NKG2D на поверхности NK-клеток значительно снижало их дегрануляцию в ответ на iPS-fibro даже при отсутствии на поверхности iPS-fibro HLA класса I, которые относятся к ингибирующим лигандам. Кроме того, нокаут *MICA* – важнейшего лиганда NKG2D – уменьшал иммуногенность iPS-fibro до уровня нативных фибробластов кожи.

Таким образом, активация аутологичных и аллогенных NK-клеток в ответ на дифференцированные производные ИПСК опосредована осью NKG2D–MICA.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием «Органоид сердца 25-27», 125030703325-7.

Новая роль гена *CNTN6* в раннем развитии коры головного мозга человека

Т.А. Шнайдер^{1,2*}, А.М. Юнусова^{1,2}, А.С. Князева^{1,2}, С.А. Яковлева^{1,2}, И.Е. Пристяжнюк¹, П.С. Белокопытова^{1,2}, А.А. Хабарова¹, А.С. Рыжкова¹, А.В. Смирнов¹, О.Л. Серов^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* shnayer.t@yandex.ru

Ключевые слова: нейроразвитие; *CNTN6*; церебральные органоиды

A novel role of the *CNTN6* gene in early human cortical development

T.A. Shnaider^{1,2*}, A.M. Yunusova^{1,2}, A.S. Knyazeva^{1,2}, S.A. Yakovleva^{1,2}, I.E. Pristyazhnuk¹, P.S. Belokopytova^{1,2}, A.A. Khabarova¹, A.S. Ryzhkova¹, A.V. Smirnov¹, O.L. Serov^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* shnayer.t@yandex.ru

Key words: neurodevelopment; *CNTN6*; cerebral organoids

Патологии развития головного мозга представляют собой гетерогенную группу заболеваний с выраженным генетическим компонентом, включая нарушения, обусловленные вариациями числа копий (CNV). Одним из генов, вовлеченных в данные патологии, является *CNTN6*, CNV в области которого ассоциированы с умственной отсталостью и расстройствами аутистического спектра. Однако клеточные и молекулярные механизмы действия *CNTN6* в развитии головного мозга человека остаются практически неизученными, что в значительной степени связано с ограниченной применимостью животных моделей. В данной работе с использованием технологии церебральных органоидов и CRISPR/Cas9-редактирования генома мы исследовали функции локуса *CNTN6* на ранних стадиях кортикогенеза человека. Установлено, что *CNTN6* locus регулирует морфогенез и определение судьбы клеток радиальной глии и их пролиферацию, реализуя данные эффекты преимущественно через сигнальный путь Notch. Так же мы обнаружили, что *CNTN6* участвует в ядерно-цитоплазматической транслокации белка PAX6, одного из ключевых регуляторов развития кортекса. Дополнительно, наши данные указывают, что эволюционно ускоренные регионы – HAR (human accelerated regions), локализованные в локусе *CNTN6*, могут вносить дополнительный вклад в специфическую активность этого гена в раннем нейроразвитии человека.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-29-04067), Российского научного фонда (проект №24-24-00447) <https://rscf.ru/project/24-24-00447/>.

Flow cytometry as a tool for extracellular vesicles phenotyping in immune diseases

A.D. Aquino*, I.A. Artemyev, O.V. Kalinina, P.A. Fedotov, A.L. Maslyanskiy, A.S. Golovkin
Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia
* akino97@bk.ru

Key words: extracellular vesicles; flow cytometry; COVID-19; axial spondylitis; heart transplantation

The aim of this study was to analyze extracellular vesicles (EVs) of blood plasma using high-sensitivity flow cytometry in patients with COVID-19 (15 patients), axial spondylitis (41), and after heart transplantation (23 with and 20 without acute rejection), to evaluate the diagnostic significance of the method. In patients with acute COVID-19, there was a significant increase in the levels of EVs expressing CD63+ (288 (220; 393) events/ μ L) and CD294+ (154 (113; 199) events/ μ L) compared to healthy donors (HD) (60 (55; 81) and 54 (37; 75) events/ μ L, respectively, $p < 0.01$), and a decrease in EVs expressing HLA-DR+ (74 (140; 328)) and CD45+ (96 (78; 111)) compared to HD (662 (444; 1084) and 560 (204; 1476) events/ μ L, respectively, $p < 0.01$). For axial spondylitis, there was a significant increase in the levels of CD3+ and CD19+ EVs compared to HD (282 events/ μ L (197; 1210) vs. 39 events/ μ L (31.75; 69.25) and 177 events/ μ L (55; 420) vs. 13 events/ μ L (4.750; 26.50), respectively, $p < 0.0001$). Additionally, there was an increase in EVs expressing HLA-A, B, C and HLA-DR in patients compared to the HD (4088 events/ μ L (1937; 11810) vs. 2340 events/ μ L (1820; 3708), $p = 0.0301$ and 4799 events/ μ L (1763; 20420) vs. 827 events/ μ L (265.3; 2721), $p = 0.002$, respectively). Patients with acute rejection after heart transplantation revealed a significant decrease ($p = 0.009$) in CD90+ EVs 3.4 (0.5; 181.1) vs. 2017.5 (8.0; 14225) and in CD81+ EVs 100 (40; 170) vs. 240 (75; 660) events/mL. These findings suggest that the analysis of extracellular vesicles using flow cytometry can provide valuable insights into different pathological conditions, potentially serving as diagnostic markers for immune-related diseases.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-15-20016, <https://rscf.ru/project/24-15-20016/>) and was supported by the Saint-Petersburg Science Foundation (project No. 24-15-20016).

Playing with X-chromosome epigenetics in human primed and naïve pluripotent stem cells

Mhd.A. Arssan*, A.I. Shevchenko, I.S. Zakharova

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

* *arsanmhdamin@yandex.ru*

Key words: human pluripotent cells; naïve and primed pluripotency; X chromosome epigenetics; SRC kinase signaling

Human pluripotent stem cell (hPSC) lines bearing two X chromosomes maintain them in a heterogeneous epigenetic state. Primed hPSCs mirroring late post-implantation epiblast at gastrulation onset display one active (Xa) and one inactive (Xi) X chromosomes. However, Xi often became partially re-activated, showing what is termed an ‘eroded state’ (Xe) that invariably passes on to differentiation derivatives, causing a deleterious imbalance in gene dosage. Naïve hPSCs reflecting early pre-implantation epiblast show two Xa, while previous Xi or Xe is not complete reactivated chromatin and remembers it was inactive. Differentiation of naïve hPSCs results in skewed X chromosome inactivation favouring the former Xi. Furthermore, not all naïve media permit X chromosome inactivation after hPSC differentiation. Therefore, strategies are needed to control the X chromosome epigenetic states to ensure that naïve and primed hPSCs have no limitations for biomedical applications.

In this study, we found that the SRC kinase inhibitor (SRCi) is essential for competence to restart X chromosome inactivation (XCI). SRCi is a key component in the media that enables naïve hPSCs to regain its ability to undergo biased XCI upon differentiation. Furthermore, we demonstrated that SRCi can trigger XCI in primed hPSC lines, restoring the normal Xi state. Interestingly, in this case, XCI restarts via a transient stage when inactive markers are appeared on both X chromosomes. We speculate that the reason for skewed XCI is that the X chromosomes in naïve hPSCs do not become epigenetically equivalent. Indeed, we found that naïve hPSCs with epigenetically equivalent X chromosomes can trigger random XCI during differentiation. Moreover, we demonstrated that the capacity to reproduce random XCI is restored when naïve hPSCs are shifted to the totipotent state. This transition presumably erases the epigenetic memory of the former Xi and reestablishes the ability to implement the mechanisms of counting and random X-chromosome choice upon XCI during differentiation. Overall, we have developed several approaches to regulate the epigenetic state of the X chromosome in both naïve and primed hPSCs. These approaches will contribute to the stability of hPSC lines and their differentiated derivatives, providing reliable results for biomedical research and paving the way for hPSC use in regenerative medicine.

Funding: The work was supported by the State project of the Institute of Cytology and Genetics, FWNR-2022–0015.

miRNA and cell free-circulated mitochondrial DNA as potential biomarkers of lung cancer

R.I. Bersimbay*, O.V. Bulgakova, A.A. Kussainova, A.A. Aripova

Institute of Cell Biology and Biotechnology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

** ribers@mail.ru*

Key words: lung cancer; miRNA; free-circulating mitochondrial DNA; radon; asbest; ROS

Lung cancer is the most common form of malignant neoplasia. According to the Institute of Oncology and Radiology, lung cancer in the Republic of Kazakhstan ranks second and accounts for 11.1% of all cases in the structure of oncological diseases. The search for biomarkers that can become highly sensitive and specific molecular markers for the early diagnosis of this pathology remains in great demand. Lung cancer is a multifactorial disease based not only on genetic factors, but also on environmental factors. The International Agency for Research on Cancer has identified exposure to radon and asbestos as major carcinogenic risk factors for lung cancer. It has been shown that radon can induce specific genetic and epigenetic changes in lung tissue, leading to aberrant function of oncogenes and tumor suppressor genes.

In recent years, in the laboratory of molecular genetics of the Institute of Cell Biology and Biotechnology of L.N. Gumilyov Eurasian National University, research has been actively carried out to study the role of miRNA and free-circulating mitochondrial DNA (cf-mitDNA) as biomarkers for non-invasive diagnosis of lung cancer.

The epigenetic basis of lung cancer is primarily associated with changes in miRNAs profiles. We examined the expression level of miR-19b-3p and hsa-miR-125b-5p in patients diagnosed with lung cancer. Overexpression of miR-19b-3p was revealed in malignant lung tumors. The expression profile was also significantly changed of the exosomal fraction hsa-miR-125b-5p and hsa-miR-320c in the blood plasma of people exposed to high doses of radon. In addition, a dose-dependent effect of radon on the expression of these miRNAs was found. On the lung fibroblast cell line MRC5, a change in the expression profile of 6 types of microRNAs under the influence of chrysotile asbestos was shown: hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-376b-3p, hsa-miR-1202 and hsa-miR-122.

Our studies have demonstrated that cf-mtDNA may be another promising biomarker of changes in lung tissue under the influence of carcinogenic factors. In individuals living in areas with elevated radon levels, this indicator was significantly higher not only in comparison with the control group, but also in comparison with patients with lung cancer not caused by radon. It has also been shown to be a sensitive and specific biomarker for radon-induced lung cancer.

One of the main damaging mechanisms of asbestos is the induction of oxidative cellular stress and its genotoxic effect due to an increase in ROS content. The result is damage to cellular components and DNA. We found a dose-dependent increase in ROS level in a MRC5 cell line exposed to asbestos. Chrysotile asbestos shows a dose- and time-dependent cytotoxic effect on lung fibroblasts. Lung cancer's molecular basis involves accumulating genetic and epigenetic changes, weakening DNA structure and increasing mutation susceptibility. Exposure to both radon and asbestos has been shown to increase the levels of pro-inflammatory cytokines. Our studies suggest that radon and asbestos alter miRNAs expression, leading to bronchial epithelial cell death and the release of cf-mtDNA. This activates the NF- κ B pathway, triggering inflammation, a key factor in oncogenesis. Mitochondria play a central role in malignant transformation, including lung cancer. These findings highlight the potential of miRNAs and cf-mtDNA as biomarkers for non-invasive lung cancer diagnosis, disease prognosis, and indicators of environmental risk factors for lung malignancies.

Efficient genome editing using AsCas12a-VLPs produced with Pol II-transcribed crRNA

S.E. Borovikova, M.V. Shepelev, N.A. Kruglova*

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

* *natalya.a.kruglova@yandex.ru*

Key words: CRISPR/Cas; virus-like particles; CRISPR delivery; Cas12a

HIV- and MMLV-based virus-like particles (VLPs) are a promising delivery vehicle for CRISPR/Cas gene editing tools in the form of ribonucleoprotein (RNP) complexes of Cas nuclease and guide RNA (gRNA). VLPs combine the advantages of viral transduction and gene editing with RNP, can target specific cell populations due to pseudotyping and are potentially applicable *in vivo*. In most VLP systems RNP complexes are incorporated via the fusion or induced interaction of nucleases with Gag, whereas gRNA is packaged only as a complex with the nuclease. VLPs assemble in the cytoplasm, but gRNA is mostly expressed from the RNA polymerase III (Pol III)-transcribed U6 promoter and enriched in the nucleus, which hinders its packaging and reduces VLP editing efficiency.

As an approach to overcome this problem, we replaced SpCas9, which had been used in all previous VLP systems, by AsCas12a which can excise mature crRNA from a pre-crRNA transcript. Using the nuclease packaging mechanism of NanoMEDIC VLPs, we produced VLPs with AsCas12a and crRNA expressed from the Pol II-dependent CMV promoter. crRNA was directed into the cytoplasm as part of a Pol II-driven transcript and excised by AsCas12a followed by RNP formation and packaging into VLPs. The CMV-driven crRNA increased the knockout levels of transgenes in 293 cells from 30% to 50–90% and raised the level of endogenous *CXCR4* knockout in Jurkat T cells from 1% to 20%. Replacing a single crRNA with an array of three or six identical crRNAs improved *CXCR4* knockout rates by up to 60–70%. The RT-qPCR method that we developed for the quantification of crRNA confirmed increased crRNA levels in VLP samples with six crRNA copies. Pseudotyping AsCas12a-VLPs with a combination of VSVG and BaEVRless further improved editing efficiency by enhancing transduction levels. As a result of all modifications, *CXCR4* knockout levels in Jurkat T cells increased from the background levels to 80%. This effect was observed not only for NanoMEDIC VLPs but also for AsCas12a-containing eVLPs and Cas-VLPs based on another packaging mechanism. Regardless of promoter usage, the editing efficiencies of AsCas12a-VLPs were always higher compared to SpCas9-VLPs. AsCas12a-VLPs mediated the knock-in of the HIV fusion inhibitor MT-C34 into the *CXCR4* locus, achieving 60% knock-in levels with an AAV6 donor. Collectively, we proposed a method to improve VLP editing efficiency using AsCas12a with its pre-crRNA processing activity and Pol II-driven crRNA.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-15-00381-P.

Leveraging CRISPR-Cas9 for neurodegenerative disease research

H. Davtyan^{1,2*}, J.P. Chadarevian^{1,2}, M. Blurton-Jones^{1,2,3}

¹ *Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, University of California, Irvine, Irvine, CA, USA*

² *Sue and Bill Gross Stem Cell Research Center, University of California, Irvine, Irvine, CA, USA*

³ *Department of Neurobiology & Behavior, University of California, Irvine, Irvine, CA, USA*

* *hdavtyan@uci.edu*

Key words: CRISPR-Cas9; microglia; iPSC; neurodegenerative diseases

The development of CRISPR-Cas9 gene editing and induced pluripotent stem cell (iPSC) technology have revolutionized the investigation of neurodegenerative disease. Our research leverages these advancements to investigate human microglia biology and develop novel therapeutic strategies. As the innate immune cell of the brain, microglia are highly implicated across several neurodegenerative disorders like Alzheimer's Disease (AD). In our lab, we have utilized CRISPR-editing to investigate the impact of AD-variants like the *PLCG2 P522R* mutation on iPSC-derived microglia in chimeric animal models. Second, we have deployed genetic-correction of pathogenic mutations to examine the therapeutic potential for microglia transplantation for the treatment of primary microgliopathies like CSF1R-related leukoencephalopathy. Lastly, we recently harnessed CRISPR-editing to engineer iPSC-microglia as "living drugs" capable of delivering disease-modifying payloads from within the CNS. Collectively, these studies highlight the transformative power of CRISPR-Cas9 gene editing as both a fundamental research tool and a platform for creating next-generation treatments for neurodegenerative disease.

Funding: This study is supported by NIA T32 AG073088 and NIA T32 AG00096 (both J.P.C.); NIH AG061895 (H.D.); NIH AG048099, NIH AG055524, NIH AG056303, NIH U19 AG06970101, CIRM RT3-07893, and the Cure Alzheimer's Fund (M.B.J.). iPSC lines were generated by the UCI-ADRC iPS cell core funded by NIH AG016573.

Exploring aldehyde chain length selectivity in bacterial luciferases

A.A. Deeva^{1,2*}, A.K. Lyapina¹, A.E. Lisitsa¹, E.V. Nemtseva^{1,3}

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Surgut State University, Surgut, Russia

³ Institute of Biophysics, SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

* adeeva@sfu-kras.ru

Key words: bacterial bioluminescence; molecular docking; protein evolution; substrate specificity

Bacterial luciferases are homologous enzymes that catalyze the light-emitting reaction, using myristyl aldehyde as one of the substrates. Other saturated aldehydes (C8-C16) can also participate in the reaction *in vitro*. Despite the high structural similarity among luciferases from different bacterial species, the reaction kinetics and light intensity vary with enzyme origin and aldehyde chain length. Although previous studies have characterized hydrocarbon tail interactions in the active center of *Vibrio harveyi* luciferase [1], the structural details of the aldehyde binding site for other species remain unclear.

Considering the divergence of bacterial luciferases into two structural groups, this study aimed to characterize their aldehyde interactions through molecular docking. Structural findings were integrated with evolutionary selection analysis and validated against experimental data on luciferase affinity for aldehydes of varying chain lengths.

Molecular docking was performed in AutoDock Vina. Two representative luciferases from distinct structural groups were selected: (1) *V. harveyi* luciferase (PDB ID: 3FGC) and (2) a model of *Photobacterium leiognathi* luciferase. Both protein structures contained the C4a-hydroperoxyflavin, relative to which the docking search space was defined. 28 luciferase sequences from the NCBI database were analyzed for dN/dS ratio using a sliding window approach in DnaSP. Bioluminescence kinetics were measured using stopped-flow technique with SX-20 analyzer (Applied Photophysics).

Molecular docking revealed mostly similar binding modes for the two studied luciferases, with the exception of a buried region containing Phe8 in *P. leiognathi*. dN/dS analysis identified strong purifying selection in regions encoding the active center. In contrast, the predicted aldehyde binding cavity showed positive selection at residues related to regions 6–8 and 191–195 of the amino acid sequence. The kinetics of bioluminescence were consistent with docking results: the affinity for aldehydes decreased with chain lengths shorter than tetradecanal.

Funding: The study is supported the grant of Russian Science Foundation, No. 25-24-00617, <http://rscf.ru/443/prjcard/?rid=25-24-00617>.

References

1. Brodl E., Ivkovic J., Tabib C.R. et al. Synthesis of α , β -unsaturated aldehydes as potential substrates for bacterial luciferases. *Bioorg Med Chem.* 2017;25(4):1487-1495

Wnt/ β -catenin activation attenuates osteogenic differentiation and inflammation in female aortic valve interstitial cells

P.M. Docshin^{1,2*}, P.D. Kuchur², N.V. Boyarskaya^{1,2}, E.A. Repkin³, V.E. Uspenskiy¹, A.B. Malashicheva²

¹ Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

* dokshin_pm@almazovcentre.ru

Key words: calcific aortic valve disease; sex-specific differences; human aortic valve interstitial cells; Wnt/ β -catenin signaling; osteogenic differentiation; inflammation

Calcific aortic valve disease (CAVD) is characterized by progressive fibro-calcific remodeling of the aortic valve, driven in part by osteogenic differentiation of human aortic valve interstitial cells (HAVICs). Clinically, men tend to exhibit greater calcification burden, while women display more fibrosis, yet the molecular mechanisms underlying these sex-specific differences remain unclear. We analyzed clinical, transcriptomic, and proteomic data from patients with aortic stenosis to dissect sex-specific mechanisms of calcification. Calcification severity and activity were assessed using Agatston scores, ¹⁸F-NaF PET/CT, and echocardiography. HAVICs were isolated from male and female patients and subjected to osteogenic differentiation *in vitro*. Bulk RNA sequencing and LC-MS/MS proteomics were performed. Gene set enrichment and differential expression analyses identified sex-specific regulatory pathways. Clinically, men had significantly higher aortic valve calcium scores and ¹⁸F-NaF uptake, whereas in women, ¹⁸F-NaF uptake correlated with OPG/sRANKL ratios. *In vitro*, female HAVICs showed higher osteogenic calcification than male cells. Both sexes shared enrichment in canonical osteogenic pathways (Wnt, PI3K-Akt, ECM-receptor interaction), but female HAVICs also upregulated angiogenic and hormone response pathways. DKK1 – a Wnt pathway inhibitor – was significantly upregulated in female cells, suggesting suppression of this pathway during differentiation. To explore the role of Wnt signaling, β -catenin was overexpressed in HAVICs from female donors. Activation of Wnt/ β -catenin in female HAVICs reduced calcification (Alizarin Red), osteogenic marker expression, and caspase-1 activity. This study reveals sex-specific molecular programs in HAVIC calcification, with Wnt inhibition potentially shaping the female phenotype, and highlights Wnt/ β -catenin as a target for sex-specific CAVD therapies.

Funding: Supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301, 20.04.2022). HPLC-MS/MS was performed at the Resource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University.

Creation of a panel of mammalian cell lines with CRISPR/Cas9 knockout of DNA repair genes

N.S. Dyrkheeva^{1*}, A.L. Zakharenko¹, I.A. Chernyshova¹, A.A. Malakhova², S.P. Medvedev², S.M. Zakian², O.I. Lavrik¹

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

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

* dyrkheeva.n.s@gmail.com

Key words: DNA repair; poly(ADP-ribose) polymerase 1; tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1; knockout cell line; HEK293A; A549

DNA repair is an important mechanism for maintaining genome integrity. The main methods of treating cancer, chemo- and radiotherapy, are based, among other things, on DNA damage. To date, many studies are aimed at finding inhibitors of DNA repair enzymes. Using the CRISPR method, we obtained cell clones of the HEK293 and A549 lines with deletions in the genes of enzymes participating in the DNA repair system, including knockout of *TDPI* (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1) and *PARP1* (poly-ADP-ribose polymerase 1). We use the obtained cell clones with DNA repair genes knockout as a cell model to study the role of these enzymes in DNA repair process and in the response to chemotherapy, as well as the mechanisms of action of anti-cancer therapy using inhibitors of these enzymes.

PARP1 is an enzyme that controls many cellular processes via PARylation, including repair of the topoisomerase I complex with DNA (TOP1-DNA) by TDP1. TDP1 removes covalent adducts from the 3' ends of DNA formed under the action of antitumor drugs that inhibit TOP1. The antitumor activity of the drugs topotecan and irinotecan is based on the ability to inhibit the TOP1 enzyme, stabilizing TOP1-DNA complexes that leads to the accumulation of DNA breaks and the death of tumor cells. The ability of TDP1 to hydrolyze TOP1-DNA complexes leads to a decrease in the therapeutic effect of TOP1 inhibitors, so the study of potential TDP1 inhibitors is a promising strategy for searching for new anticancer drugs.

We performed transcriptomic analysis of human embryonic kidney cell lines HEK293A for wild type and *TDPI* or *PARP1* knockout, treated with topotecan and the effective TDP1 inhibitor that we found earlier. Maximal changes in gene expression levels were found with knockout of the *PARP1* gene compared to *TDPI*. The largest number of differentially expressed genes (DEGs) in *PARP1* knockout are associated with DNA repair, ribosome biogenesis, transcription and cancer development, proteasome, apoptosis, cell cycle control and protein processing. Several hundred DEGs in signaling pathways associated with protein processing, apoptosis, cell cycle control, and proliferation were found in *TDPI* knockout or drug-treated cell clones. A number of DEGs were found among metastasis-related genes common to *TDPI* knockout and TDP1 inhibitor treatment.

Funding: The work was supported by Russian Science Foundation, No. 25-74-30006.

Genome editing: from chromatin dynamics to precision therapeutics

D.Y. Guschin^{1*}, A.G. Bykonya^{1,2}, N.A. Barlev², A.V. Zvyagin¹

¹ Department of translational medicine, Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

² Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

* guschin.dy@talantiuspeh.ru

Key words: CRISPR; genome editing; precision therapeutics; chromatin; safe harbor loci

Genome engineering technologies, including CRISPR-Cas9, ZFNs, and TALENs, enable a wide spectrum of fundamental and translational research, ranging from precise dissection of chromatin architecture and dynamics to therapeutic correction of disease-causing mutations. We demonstrate allele-selective transcriptional repression of mutant *HTT* in Huntington's disease using engineered zinc finger repressors fused to Krüppel-associated box (KRAB) domains, achieving >70% reduction of pathogenic protein aggregates in patient-derived neuronal models while preserving wild-type allele expression. In cystic fibrosis, ZFN-mediated correction of the *CFTR* $\Delta F508$ mutation in induced pluripotent stem cells (iPSCs) restored chloride channel function to near-wild-type levels, with electrophysiological confirmation in differentiated airway organoids showing sustained rescue. For cancer immunotherapy, ZFN-based targeted disruption of *PD-1* via homology-directed repair in tumor-infiltrating lymphocytes enhanced cytotoxic T-cell activity and memory formation, driving complete tumor regression in metastatic melanoma PDX models. Similarly, *IL2RG* correction in hematopoietic stem/progenitor cells achieved multilineage engraftment and restored NK-cell cytotoxicity in SCID-X1 xenotransplant systems. Our recent work established clonally verified CRISPR-engineered reporter cell lines through site-specific integration into genomically stable safe harbor loci (*AAVS1*, *ROSA26*). We investigate whether this targeted approach improves signal consistency compared to random integration and enables superior longitudinal monitoring of TGF- β signaling dynamics. Our long-time goal is to bridge chromatin-scale mechanistic insights to clinical translation, using genome editing's dual utility as a versatile discovery platform and transformative therapeutic modality for precision medicine.

Funding: Supported in part by the RSF (Grant No. 22-14-00075) and FDCRGP grant #2012022FD41 from Nazarbayev University.

Artificial intelligence for predicting chromosomal rearrangements in cancer genomes

P.E. Karitskaia*, Y.V. Vyatkin

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*p.karitskaya@g.nsu.ru

Key words: machine learning; deep learning; structural variations; chromothripsis; cancer diagnostics

Chromothripsis is a catastrophic genomic event involving massive chromosomal rearrangements, often linked to poor prognosis in cancer [1]. Detecting such events is clinically valuable, but current methods are either manual or data-specific [2, 3]. We aimed to develop predictive models for chromothripsis using classical machine learning and deep learning. Data from ChromothripsisDB yielded 19713 events after preprocessing [4].

Classical methods used aggregated features of structural variations. Logistic regression, SVM, random forest, and XGBoost were tested. SMOTE and class weighting addressed class imbalance (11.4% positive cases). XGBoost performed best (ROC AUC 0.93, PR AUC 0.78).

Deep learning employed a BiLSTM with attention, trained on sequences of 200 SV events, each described by 10 features [5]. Weighted sampling and combined Focal + F1 loss addressed imbalance. 10-fold stratified cross-validation showed BiLSTM outperformed classical models (ROC AUC 0.95, PR AUC 0.94).

These results confirm that deep learning models are more effective at capturing complex spatial and contextual patterns in structural variation data compared to aggregated feature-based methods. The proposed approach demonstrates strong potential for developing accurate and automated diagnostic tools for genome instability in cancer.

References

1. Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B. et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell*. 2011;144:27-40
2. Govind S.K., Zia A., Hennings-Yeomans P.H. et al. ShatterProof: operational detection and quantification of chromothripsis. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:78. doi 10.1186/1471-2105-15-78
3. Yu J., Chen N., Zheng Z. et al. Chromothripsis detection with multiple myeloma patients based on deep graph learning. *Bioinformatics*. 2023;39(7):btad422. doi 10.1093/bioinformatics/btad422
4. Cortés-Ciriano I., Lee J.J.-K., Xi R. et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat Genet*. 2020;52:331-341
5. Schuster M., Paliwal K.K. Bidirectional recurrent neural networks. *IEEE Trans Signal Process*. 1997;45:2673-2681

Enhancing elite wheat variety adaptability using genome editing

A.A. Kiseleva^{1,2*}, E.M. Timonova^{1,2}, A.A. Berezhnaya¹, A.E. Kolozhvari^{1,2}, E.A. Salina^{1,2}

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

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* antkiseleva@bionet.nsc.ru

Key words: *Triticum aestivum*; plant adaptability; heading time

Improving the adaptability of high-yielding wheat cultivars is a key strategy for advancing sustainable crop production. One effective approach is to shorten the growth cycle, as early-flowering varieties typically exhibit higher daily productivity than medium- or late-flowering counterparts. Therefore, tuning heading time is a critical breeding objective.

In this study, we focused on the elite spring wheat line Velut, which combines high yield potential, disease resistance, and strong regenerative capacity. However, its late heading limits its adaptability to the agroclimatic conditions of the Urals and Western Siberia – major regions for spring wheat cultivation in Russia.

Using CRISPR/Cas9-mediated genome editing, we introduced targeted mutations into the promoter regions of *PPD-1* genes. A total of 46 T0 plants carrying diverse promoter variants were obtained. Phenotypic evaluation of T1 progeny revealed a significant reduction in heading time compared to wild-type Velut. The advancement ranged from 2.1 to 5.4 days. Seven mutant lines with distinct promoter deletions were selected and advanced to the T2 generation, where stable homozygous mutations were confirmed in the absence of vector. These plants were used to confirm the effect of the introduced mutations on phenotype.

Targeted deletions within the promoter region encompassed binding sites of the transcriptional repressor CHE. Plants with such mutations exhibited accelerated heading. Diurnal expression profiling demonstrated altered *PPD-1* transcriptional rhythms in the edited lines, consistent with the loss of repressor binding. Moreover, differential expression patterns among the edited lines suggest that additional regulatory elements or transcription factors may contribute to *PPD-1* regulation.

As a result, we generated a set of wheat lines harboring defined promoter mutations in *Ppd-B1* and *Ppd-D1*. These lines represent valuable genetic material for dissecting the cis-regulatory architecture of photoperiod response genes and for developing early-flowering, climate-adapted wheat cultivars.

Funding: The study is supported by the RSCF No. 21-76-30003-II, <https://www.rscf.ru/project/21-76-30003/>.

Investigation of the glioblastoma stem-like cells resistance mechanisms to auranofin by the genome-wide knockout CRISPR screening

M.Yu. Kordyukova^{1*}, T.K. Bulgakov¹, O.A. Ivanov¹, O.M. Kudryashova¹, G.R. Gazizova², E.I. Shagimardanova⁴, O.A. Gusev^{1,4}, E.K. Shevchenko¹, V.V. Belousov^{1,3,4}

¹ *Federal Center of Brain Research and Neurotechnology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia*

² *Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

³ *Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia*

⁴ *Lift Center, Moscow, Russia*

* *kordyukova.maria@yahoo.com*

Key words: glioblastoma; auranofin; chemoresistance; CRISPR screening

Glioblastoma (GBM) is a brain tumor characterized by aggressiveness and tolerance to therapy, largely due to increased resistance to oxidative stress. Auranofin, an inhibitor of the thioredoxin reductase antioxidant system, is highly toxic to GBM cells and is a promising drug for therapy. However, we have previously shown that GBM cells are heterogeneous in their sensitivity to auranofin. The aim of this work was to study the mechanisms of resistance to auranofin in GBM cells using genome-wide CRISPR screening.

For the study, we used 2 cultures of stem-like GBM cells obtained from postoperative patients' material earlier; the cultures differed in their resistance to auranofin. For CRISPR screening, the cells were transduced with viral particles carrying the Toronto KnockOut CRISPR Library V3 [1]. After puromycin selection, the cells were divided into 2 parts, to the first part auranofin was added at an inhibitory concentration of IC20 for negative selection to determine the genes of resistance to the drug, or auranofin at a concentration of IC90 for positive selection to search for genes of sensitivity to the drug, to the second part (control) the appropriate amount of DMSO was added. The cells were cultured in the presence of the drug, then the genomic DNA isolated from the cells was sequenced. Then bioinformatics data processing was performed.

As a result, a number of genes were identified, the knockout of which led to sensitization to auranofin, including genes encoding components of antioxidant systems, proteins of transport and detoxification of xenobiotics, proteins of cellular signaling, components of mitochondria, proteins of repair, replication, splicing, autophagy.

Identification of the mechanisms of cell resistance to auranofin will allow developing approaches to overcome it. The results of the study may also be useful for understanding the mechanisms of tumor resistance to redox therapeutic drugs and chemotherapy in general.

References

1. Hart T., Tong A.H.Y., Chan K. et al. Evaluation and Design of Genome-Wide CRISPR/SpCas9 Knockout Screens. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(8):2719-2727

Can ZEB1 be a prognostic factor for uveal melanoma?

O.A. Koval^{1*}, M.V. Zhilnikova¹, S.P. Zvereva¹, M.M. Biryukov¹, M.N. Balantaeva¹, D.V. Chernih^{1,2}, O.M. Stanishevskaya^{1,2}, V.V. Atamanov^{1,2}

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

² *The S. Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, the Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia*

* *o.koval@niboch.nsc.ru*

Key words: uveal melanoma; ZEB1; VEGF-A

Melanoma is a heterogeneous disease that includes tumors of various localizations. Uveal melanoma (UM) is the most prevalent primary ocular cancer, representing 5% of all melanomas. UM and cutaneous melanoma (CM) have the same melanocytic origin, however genetic and molecular changes in cancer are different for the uveal melanocytes and skin melanocytes, as well as spread of metastases. Thus, targeted drugs for the treatment of CM are usually ineffective for UM. This is primarily due to the fact the eye is an immunologically privileged organ, and it fails to achieve efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) comparable to that for CM. Moreover, there is a poor understanding of the role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in UM progression. These features of UM bring it closer to brain tumors, as well as low sensitivity to immunotherapy, and actualize the search for new approaches to the treatment of the highly lethal metastatic form of UM.

Since hypoxia is a major stimulator of EMT, in this study we looked at the interaction of the hypoxia-related genes: ZEB1, VEGF-A and VEGFR, and metastatic potential of these UM cells in vivo. Eight personal UM cell cultures previously obtained in the laboratory from tumor samples were used as models. The transcriptional and translational response to hypoxia of the ZEB1, TWIST1, VEGF-A, and FLT1 (VEGFR) genes was studied, as well as the effect of knockdown of these genes and targeted VEGF-A inhibitor Eylea (Aflibercept) on cell viability. Eylea is a soluble decoy receptor, with substantially higher affinity than conventional soluble VEGF receptors.

We showed that the ZEB1 response of UM cells to hypoxia is associated with basal ZEB1 levels, and cells with ZEB1-/low phenotype have greater plasticity in response to hypoxia. Most lines with the ZEB1- phenotype increased ZEB1 production in response to hypoxia, but there were lines in which hypoxia did not change the ZEB1- phenotype. At the same time, cells with a high basal level of ZEB1 decreased the protein level in response to hypoxia. Another feature of the cell with ZEB1- phenotype was the lack of the increase of VEGF-A synthesis in response to hypoxia, and which was observed for cells with the ZEB1+ phenotype.

We suppose that better understanding of the relationship between ZEB1 and VEGF-A may bring new approach for preventing metastasis of UM cells and help confirm ZEB1 as a prognostic marker.

Funding: The study is supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 23-14-00285 and was realized within Russian state-funded project for ICBFM SB RAS No. 121030200173-6.

ZNF536 dysfunction in neuronal development: a CRISPR/Cas9-based investigation of schizophrenia risk gene function

A.O. Kurishev^{1,2*}, D.A. Abashkin¹, D.S. Karpov^{1,2}, V.E. Golimbet¹

¹ *Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

* *kurishartt@gmail.com*

Key words: ZNF536; schizophrenia; SH-SY5Y; retinoic acid; neuronal differentiation; transcriptome; CRISPR/Cas9

Zinc Finger Protein 536 (ZNF536), a brain-specific transcriptional repressor that negatively regulates neuron differentiation by repressing retinoic acid-induced gene transcription. ZNF536 has been recognized as a candidate schizophrenia (SZ) risk gene through GWAS. Multiple lines of genetic evidence implicate ZNF536 in psychiatric disorders. Thus, genetic studies identified significant enrichment of schizophrenia risk alleles within the ZNF536 locus. In addition, rare *de novo* protein-truncating mutations in ZNF536 have been identified in probands with autism spectrum disorder. However, the molecular mechanisms by which ZNF536 contributes to disease pathology remain unknown. To investigate the role of ZNF536 more closely, we employed CRISPR/Cas9 genome editing to generate two distinct ZNF536 knockout mutants in human neuroblastoma cell line Sh-SY5Y: a homozygous knock-in (KI/KI) that disrupts protein function, and a compound heterozygous line (KI/del) harboring a 103 kb deletion enriched with schizophrenia-associated intronic regions. As a result, the ZNF536 mutant lines demonstrated impaired neuronal differentiation following treatment with ATRA, with KI/KI cells having little neurite formation and KI/del having intermediate phenotypes. Transcriptome profiling revealed certain compensatory mechanisms during differentiation process: KI/KI cells showed YY1-regulated gene enrichment and dysregulation of chromatin organization pathways, while KI/del cells showed E2F4-mediated regulation and selective downregulation of schizophrenia-associated synaptic genes. Retinoic acid response elements analysis showed bidirectional inverse regulation in KI/KI cells, where upregulated genes normally became downregulated and vice versa. The KI/del model confirmed functional significance of intronic regulatory elements with a notable downregulation of adjacent gene TSHZ3 and enrichment in psychiatric disorder-associated genes. To sum up, our findings indicate that ZNF536 might be potential regulator of retinoic acid-responsive gene networks and neuronal differentiation.

Funding: The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-technical program for genetic technologies development for 2019–2030, agreement No. 075-15-2025-474 of 29.05.2025).

Poly(ADP-ribose) polymerases: role in genome stability and editing

O.I. Lavrik*

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia** lavrik@lbio.ru**Key words:** poly(ADP-ribose) polymerases; genome editing; DNA repair

Poly(ADP-ribosyl)ation of proteins catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerases (PARP), primarily PARP1, regulates important cellular processes such as chromatin remodeling, replication, transcription, and DNA repair in higher eukaryotes. Upon interaction with damaged DNA, PARP1 catalyzes the synthesis of ADP-ribose polymer (PAR). PAR can be attached to acceptor proteins or to PARP1 itself. This process leads to chromatin reorganization and the formation of functional protein complexes providing DNA repair and, as a consequence, genome stability. Genome editing using CRISPR/Cas technology results in changes of the DNA structure, which can be a signal for the recruitment of PARP1. In our study, we did not find any effect of PARP1 and other DNA break repair proteins on the interaction of CRISPR/Cas9 with target DNA and Cas9 activity [1], but PARP enzymes and PARylation may contribute to the efficiency of genome editing by relaxing chromatin and/or forming biocondensates with the participation of PAR [2]. PARylation catalyzed by PARP1, as well as PARP2, is a key mechanism for regulating processes associated with the response to genotoxic stress and maintaining genome stability, so the activity of these enzymes also needs to be regulated. Changes in the expression level and activity of some representatives of the PARP family lead to the development of severe human diseases [3]. Data on the role of RNA-binding proteins containing disordered domains, as well as the histone PARylation factor HPF1 in the regulation of PARP1/2 activity will be presented [4]. The strategy for creating PARP1/2 inhibitors that provide specific regulation of the activity of these enzymes, as well as effective and at the same time less toxic therapy for onco- and neurodegenerative diseases will be discussed.

Funding: The study is supported by RSF, No. 21-64-00017-II.

References

1. Maltseva E.A., Vasil'eva I.A., Moor N.A. et al. Cas9 is mostly orthogonal to human systems of DNA break sensing and repair. *PLoS One*. 2023;18(11):e0294683. doi 10.1371/journal.pone.0294683
2. Sukhanova M.V., Anarbaev R.O., Maltseva E.A. et al. Divalent and multivalent cations control liquid-like assembly of poly(ADP-ribosyl)ated PARP1 into multimolecular associates *in vitro*. *Commun Biol*. 2024;7(1):1148. doi 10.1038/s42003-024-06811-4
3. Bai P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell*. 2015;58(6):947-958. doi 10.1016/j.molcel.2015.01.034
4. Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate. *DNA Repair (Amst)*. 2022;120:103423. doi 10.1016/j.dnarep.2022.103423

Antifibrotic potential of macrophage-derived conditioned media in modulation of the lung fibroblast activity

A.A. Maksimova*, M.A. Tikhonova, E.Y. Shevela, E.R. Chernykh

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

*parkinson.dses@gmail.com

Key words: macrophage; fibroblast; lung fibrosis; differentiation

Fibrosis remains a significant medical challenge due to the lack of effective treatments. Macrophages play a crucial role in the fibrotic processes and can modulate the activity of fibroblasts and myofibroblasts, key cells in fibrosis [1]. However, the distinct pro- and anti-fibrotic macrophage phenotypes and underlying mechanisms remain poorly understood.

Macrophages were differentiated from peripheral blood monocytes using M-CSF or GM-CSF. Conditioned media of macrophages (M-CM or GM-CM, respectively) were evaluated for their effects on 1) the lung fibroblast differentiation into myofibroblasts and 2) the myofibroblast de-differentiation. 3D cell cultures were used for (myo)fibroblasts. At the first stage, lung fibroblasts were exposed to TGF- β -induced differentiation in the presence of macrophage CM. Key aspects of myofibroblast activity were assessed: a) expression of myofibroblast markers (α -SMA, vimentin) (flow cytometry and fluorescent imaging); b) collagen I secretion (ELISA); c) extracellular matrix contractility (collagen gel contraction assay). At the second stage, lung fibroblasts were differentiated into myofibroblasts by TGF- β . Then, the myofibroblasts were cultured in the macrophage CM, and the above parameters were assessed, as well as apoptosis of myofibroblasts (PI and 7-AAD expression).

M-CM significantly suppressed TGF- β -induced lung fibroblast differentiation, reducing α -SMA and vimentin expression, collagen I secretion, and collagen gel contraction to baseline levels. Moreover, M-CM did not prevent spontaneous de-differentiation of lung myofibroblasts with no significant differences from control cultures. However, M-CM did not have a pro-apoptogenic effect on the lung myofibroblasts. In contrast, GM-CM showed no comparable anti-fibrotic effects.

Therefore, the data obtained suggest that M-CSF-differentiated macrophages exhibit antifibrotic potential, highlighting their potential therapeutic relevance. Further research is needed to identify the specific mediators involved.

Acknowledgements: The authors thank the Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Centre, Lomonosov MSU, for kindly providing the fibroblast cell line.

Funding: This work was financed from the budget of RIFCI, No. 0415-2021-0002.

References

1. Jiang Y., Cai R., Huang Y. et al. Macrophages in organ fibrosis: from pathogenesis to therapeutic targets. *Cell Death Discov.* 2024;10(1):487. doi 10.1038/s41420-024-02247-1

Targeted insertion of large DNA fragments into mammalian genome with site-specific integrase Bxb1

T.E. Minkovskaya, M.V. Shepelev*

Center for Genome Research, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**mshepelev@mail.ru*

Key words: CRISPR/Cas9; Bxb1 integrase; RMCE; RhoV GTPase

CRISPR/Cas9-mediated genome editing has revolutionized the generation of animal models and cell lines for biotechnology and fundamental research applications. However, the efficiency of knock-in of large DNA fragments remains low, necessitating the development of alternative approaches. These limitations can be overcome through the implementation of the Bxb1 recombination system in a combination with CRISPR/Cas technology. Bxb1 is a site-specific serine integrase that catalyzes recombination between DNA fragments bearing attP and attB recognition sites. Upon microinjection into mouse zygotes, Bxb1 demonstrates the capability to insert donor DNA fragments up to 43 kb in length into pre-existing attB sites. These recent technological advances highlight the Bxb1 system as an excellent tool for targeted genome modification.

The objective of this work was to exploit the Bxb1 recombination system for efficient targeted integration of large DNA cargos into the mammalian genome. We developed a reporter system in HEK293T cells to evaluate the efficiency of Bxb1-mediated RMCE (recombinase-mediated cassette exchange) using the insertion of an attB-flanked EGFP reporter into the genome. We engineered Bxb1 variants with increased activity by incorporating nuclear localization sequences (NLS) and demonstrated that Bxb1 containing four NLS sequences (two N-terminal and two C-terminal) exhibited the highest activity compared to other variants. Surprisingly, the recently described I87L point mutation enhanced the activity of Bxb1 variants bearing either no NLS or two N-terminal NLS sequences, but reduced the activity of Bxb1 variants containing C-terminal NLS sequences. Using CRISPR/Cas9-mediated knock-in into the *AAVS1* safe harbor locus, we generated human lung cancer cell lines NCI-H1299 and A549 containing LifeAct-mScarlet cDNA flanked by attP sites for Bxb1-mediated RMCE. Using an NCI-H1299 clonal cell line, we demonstrated the feasibility of Bxb1-driven RMCE and generated a clonal cell line with doxycycline-inducible expression of oncogenic RhoV GTPase, achieved through flow cytometry-based sorting of cells with completed RMCE based on the loss of LifeAct-mScarlet fluorescence. Our findings establish the Bxb1 recombination system as a powerful and efficient platform for targeted integration of large DNA fragments into mammalian genomes, offering significant advantages over conventional CRISPR/Cas9-mediated approaches for large cargo insertion applications.

Analysis of intracellular abnormalities associated with Cohen syndrome in Phoenix cell line with mutations of *COH1* gene

K.N. Morosova^{1,2}, E.V. Kiseleva¹, A.S. Smirnov¹, E.R. Wolf², I.E. Pristyazhnyuk^{1,3*}

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

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *Department of Genetics and Genetic Technologies, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia*

* *iprist@bionet.nsc.ru*

Key words: Cohen syndrome; ultrastructural abnormalities; Golgi apparatus; cellular pathologies

Cohen syndrome is an autosomal recessive disorder caused by compound heterozygous mutations in the *COH1* gene. This syndrome is characterized by intellectual disability, microcephaly, autistic symptoms, hypotonia, myopia, retinal dystrophy, neutropenia, and obesity [1]. *COH1* is involved in the regulation of intracellular membrane trafficking and the maintenance of the Golgi apparatus structure.

Previously, we conducted a detailed study of ultrastructural abnormalities in neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with Cohen syndrome [2]. We demonstrated that Cohen syndrome leads to complex intracellular disorganization that highlight the ultrastructural similarities between Cohen syndrome and neurodegenerative disorders.

In this work, we obtained several cell lines with mutations introduced into the *COH1* gene, based on Phoenix cells, using the CRISPR/Cas9. Mutated cell lines exhibited reduced proliferation rates compared to Phoenix cells. They also have multiple intracellular abnormalities, including Golgi apparatus fragmentation and swelling, loss of rough endoplasmic reticulum, increased numbers of autolysosomes with undigested material and number of defective mitochondria and also an amyloid-like protein aggregates in the cytoplasm.

The ultrastructural defects observed in *COH1*^{-/-} Phoenix cells closely resembled those we previously identified in neurons derived from iPSCs of Cohen syndrome patients. It means that *COH1*^{-/-} Phoenix cells serve as a valid model system for investigating Cohen syndrome-associated cellular pathologies.

Funding: The study is supported by the grant of the state program of the «Sirius» Federal Territory «Scientific and technological development of the «Sirius» Federal Territory» (Agreement №26-03, 27/09/2024) and the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, FWNR-2022-0015.

References

1. Cohen M., Hall B.D., Smith D.W. et al. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr.* 1973;83:280-284. doi 10.1016/s0022-3476(73)80493-7
2. Shnaider T.A., Khabarova A.A., Morozova K.N. et al. Ultrastructural Abnormalities in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells and Neurons of Two Cohen Syndrome Patients. *Cells.* 2023;12(23):2702. doi 10.3390/cells12232702

Engineering the secretory pathway in Chinese hamster ovary cells: beyond genome knockout

N.A. Orlova*, Yu.A. Khodak, T.I. Triska, M.V. Sinegubova, D.E. Kolesov, I.I. Vorobiev

K.G. Skryabin Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology RAS, Moscow, Russia

* nobiol@gmail.com

Key words: CHO cells; secretion; signal peptides; SRP complex; BIP

Current improvements of Chinese hamster ovary (CHO) cells predominantly focus on CRISPR/Cas9-mediated inactivation of genes that may restrict cell growth or productivity [1]. Alongside, there are alternative strategies, including optimization of signal peptides of recombinant proteins and overexpression of auxiliary genes involved in secretion. Signal peptide replacement avoids the metabolic burden of synthesizing additional polypeptides but exhibits protein-dependent efficacy. Conversely, overexpression of secretory pathway components incurs extra ATP expenditure but enables rapid evaluation of gene variants through transient transfection in established clonal producers and may offer broadly applicable improvements.

To evaluate signal peptide replacement effects, four heterodimeric gonadotropins (FSH, LH, hCG, TSH) and two antibody variants with differing expression profiles were employed as models. Heterologous signal peptides derived from azurocidin, human serum albumin, and the common alpha subunit of these hormones were tested. Expression constructs for overexpressing SRP14, SRP9, a fused SRP14-9 polypeptide, BIP (GRP78) and calreticulin under the constitutive EEF1A promoter were made.

Replacement with the human albumin signal peptide enhanced productivity by 60% for hCG, 4-fold for LH, and 13-fold for TSH, without effect on FSH [2]. For difficult-to-express antibodies produced in CRISPR-edited apoptosis-resistant CHO 4BGD cells [1], signal peptide exchange did not alter expression, whereas SRP14 overexpression increased yields by an order of magnitude. RT-PCR analyses revealed that prolonged culture leads to depletion of the BIP pool, potentially triggering UPR sensor activation and reduced productivity; however, BIP overexpression did not significantly enhance yields.

Engineering of CHO secretory pathway by combined strategies provides an effective means to overcome bottlenecks in recombinant protein biomanufacturing.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation, No. 25-24-00140.

References

1. Orlova N.A., Sinegubova M.V., Kolesov D.E. et al. Genomic and Phenotypic Characterization of CHO 4BGD Cells with Quad Knockout and Overexpression of Two Housekeeping Genes. *Cells*. 2025;14(10):692
2. Sinegubova M.V., Kolesov D.E., Vorobiev I.I., Orlova N.A. Increased glycoprotein hormone yield in stably transfected CHO cells using human serum albumin signal peptide. *PeerJ*. 2025;13:e18908

Development of small neuroprotective molecules for the treatment of Parkinson's disease associated with mutations in the *GBA1* gene: basic science and business

S.N. Pchelina^{1, 2*}

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

* pchelina-sn@pnpi.nrcki.ru

Key words: Parkinson's disease; GBA1; small molecules; activity modulators

Mutations in the *GBA1* gene, encoding lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase) cause Gaucher disease (GD) and are the most common genetic contributor to Parkinson's disease (PD). The incidence of GBA1-PD (or the Sidransky syndrome) reaches 10% in different populations including Russians. The therapy via small – molecular stabilizers, pharmacological chaperones (PCs) of GCase, are now discussed in relation to GD as well as GBA1-PD. NCGC607, GCase stabilizer, was described by the group of Sidransky [1] and different scientific groups are now trying to increase the ability of the compound using their derivatives.

We suggested the analog of NCGC607, N2 as a novel GCase PC, exhibiting the similar binding free energy compared to NCGC607, GCase activity restoration and its protein level in PBMC-derived macrophages and iPSCs-derived dopaminergic neurons from p.N370S GBA1-PD patient, but was more effective in HexSph reduction and GCase translocation to the lysosome. Notably, in PBMC-derived macrophages from GBA1-PD patients N2 resulted in a more pronounced decrease of HexSph level compared to NCGC607 and ambroxol. When GBA1-PD patients were stratified by mutation type N2 was effective on GCase activity only in p.N370S carriers, not in p.L444P carriers. Mice treated with N2 exhibited the similar increase in GCase activity in brain tissue as animals treated with ambroxol. In MPTP-treated mice N2 was also effective in decrease of GCase substrate level in brain. We believe that the allosteric GCase stabilizers could be an efficient strategy for the treatment of PD linked to *GBA1* mutations. The question that should be raised are the following: 1) on what stage the fundamental investigation in the field of small neuroprotective drugs should receive the support of pharmaceutical companies, 2) how all risks could be assessed and 3) what are the differences in collaboration of academic investigators and industrial partners in different countries.

Funding: The study is supported by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3.

References

1. Aflaki E., Borger D.K., Moaven N. et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α -Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. *J Neurosci.* 2016;36(28):7441-7452

Development of monoclonal AAV producer cell lines for the hemophilia B treatment

M.P. Perepelkina^{1*}, A.V. Fomina¹, E.V. Vlasova¹, V.R. Rodichkina¹, V.A. Markova¹, K.A. Shaitanova¹, M.A. Vasyoshenkova¹, D.I. Malkov¹, I.A. Shmykova¹, D. Charmet¹, A.I. Glagoleva¹, M.A. Mikenkina¹, A.V. Prokofyev^{1,2}, P.M. Gershovich^{1,2}

¹ Biotechnology company BIOCAD, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCPU), Saint Petersburg, Russia

* perepelkinamp@biocad.ru

Key words: gene therapy; haemophilia; recombinant adeno-associated virus; producer cell line

Hemophilia B is a rare bleeding disorder caused by lack-of-function mutations in FIX gene. The replacement therapy with recombinant or human plasma-derived FIX protein has several disadvantages despite its prevalence. Another approach that consists of FIX gene sequence delivery inside the recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) to hepatocytes has shown very promising results. rAAV vectors are a well-established and effective tool which has already proven to have relatively low toxicity and possibility to deliver the gene of interest to various cell types. However, rAAV vectors manufacturing is an expensive, time-consuming, and labor-intensive process which limits the commercial use of AAV-based gene therapies. AAV production using producer cell lines (PCLs) is desirable due to reduced costs, improved batch consistency and further up-scaled production processes when compared to AAV production by the standard transfection manufacturing process. Nevertheless, the development of PCL has been extremely challenging due to the number of integrations and constitutive expression of the viral genes that often has influence on the survival of PCLs. This study focuses on process of development of a stable AAV5-FIX PCL. To achieve this goal a step-by-step integration of the genes required for AAV5-FIX production (E2a, E4, Rep, Cap5 and FIX) into the genome of HEK293 cell line followed by single cell cloning and selection of the most optimal clones in terms of AAV-based viral vector productivity, integration stability and cell viability was performed. Induction system was used to address the toxicity of viral genes. High-throughput screening of monoclonal stable clones for rAAV productivity identified 7 top producers of AAV5-FIX with productivity $>1\text{E}+10\text{VG/ml}$. Top monoclonal PCLs were subjected to a comprehensive stability study designed to mimic the time during the production run. These results demonstrate the potential of stable PCLs to meet the growing demands of gene therapy applications and allow to create a robust platform for the AAV vectors production in the future.

Gene therapy for Hemophilia B: Arvenacogene sanparvovec

A.V. Prokofyev^{1,2*}, A.N. Strelkova¹, D.O. Rzaev¹, E.V. Yurlova¹, K.V. Solovyev¹, M.N. Ryzhkova¹, V.A. Stukanov¹, N.A. Spirina¹, P.M. Gershovich^{1,2}

¹ Biotechnology company BIOCAD, Gene Therapy Development Department, Saint Petersburg, Russia

² The Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

*prokofyevav@biocad.ru

Key words: gene therapy; hemophilia B; rAAV; Factor IX; FIX; arvenacogene sanparvovec

Hemophilia B (HB) is a genetic bleeding disorder caused by insufficient blood clotting Factor IX (FIX) activity. The standard treatment for HB involves replacement therapy with recombinant or plasma-derived FIX. In severe cases, recurrent hemarthroses may lead to osteoarthritis and increased patient disability risk even with replacement therapy.

Gene therapy utilizing recombinant adeno-associated viruses (AAV) for the delivery of a functional FIX gene represents a novel and highly promising strategy for HB treatment. AAV gene therapy for HB enables the restoration of target clotting factor levels for a duration of 5 to 10 years following a single administration of the therapeutic agent.

ANB-002 (INN: *Arvenacogene sanparvovec*), a novel gene therapy product for HB treatment, is a modified recombinant adeno-associated virus serotype 5 (AAV5) containing a codon-optimized Padua variant of the human FIX gene under the control of a liver-specific promoter. The utilization of a unique codon-optimized sequence of the FIX gene, combined with a highly efficient proprietary AAV5 capsid and the naturally occurring Padua mutation that enhances FIX protein activity, can enable the achievement of stable and high levels of FIX expression and activity with the use of our novel therapeutic product for HB gene therapy. This gene therapy represents a novel and promising approach for HB treatment compared to existing lifelong maintenance therapies using recombinant FIX.

The efficacy of *ANB-002* has been comprehensively evaluated in both *in vitro* and *in vivo* studies. Early *in vivo* studies on animal models demonstrated stable expression and activity of FIX as early as 14 days post-injection. Moreover, high levels of FIX and its activity were maintained for several months following a single administration of *ANB-002*. Subsequent preclinical studies further confirmed the long-term efficacy and safety of the drug.

The safety, immunogenicity, and efficacy of *ANB-002* in patients with moderately severe or severe HB are being evaluated in ongoing phase 1/2 clinical trial (NCT06120582). According to preliminary results of the ongoing clinical trial *ANB-002* demonstrated good tolerability, relatively high efficacy and grades 1–2 adverse reactions during the clinical trial.

Funding: The study is supported by JSC «BIOCAD».

AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in therapy in a mouse model of 21-hydroxylase deficiency

N. Sakr^{1,2*}, O.V. Glazova^{1,2}, E.N. Antonova^{1,2}, M.V. Vorontsova², P.Y. Volchikov^{1,2}

¹ Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

* sakr@genlab.llc

Key words: 21-hydroxylase deficiency; CRISPR/Cas; AAV

Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency is a monogenic disorder lacking curative treatment. Prior gene supplementation showed only transient efficacy, likely due to episomal vector loss from rapid adrenal cortex regeneration. To address this, we employed CRISPR/Cas9-mediated non-homologous end-joining (NHEJ) to knock in a functional *Cyp21a1* gene at the *Rosa26* safe harbor locus. *Cyp21a1*^{-/-} mice received AAV-DJ-Cyp21 (6.6×10^{11} vg/mouse) with or without AAV-DJ-Cas9 (2.2×10^{11} vg/mouse), or PBS.

In the adrenal glands of mice treated with AAV-Cyp21 + AAV-Cas9, site-specific integration of the *Cyp21a1* gene into the *Rosa26* locus was confirmed by PCR and Sanger sequencing. The vector genome copy number per cell (VGC/cell), measured by qPCR, was highest at week 2 (mean = 12.94, SD = 8.02), declined to 1.10 (SD = 0.71) by week 16, and reached 0.25 (SD = 0.19) by week 30. Despite this decline, VGC/cell in adrenal glands remained higher than in brain, gonads, and kidney, but was comparable to mice treated with AAV-Cyp21. Immunofluorescence confirmed 21-hydroxylase expression in the zona fasciculata of the adrenal cortex, in both treatment groups up to 30 weeks post injection. Partial correction of steroidogenesis was demonstrated by elevated serum 11-deoxycorticosterone (11-DOC) in mice treated with AAV-Cyp21 + AAV-Cas9: 2.74 nM (SD = 1.43) at week 8, 1.55 (SD = 0.58) at week 16, and 2.48 (SD = 0.69) at week 30, compared to 0.52 (SD = 0.11), 0.57 (SD = 0.20), and 0.66 nM (SD = 0.24) in PBS controls, respectively. However, 11-DOC levels in AAV-Cyp21 + AAV-Cas9-treated mice were not significantly different from those in mice treated with AAV-Cyp21. Body weight gain improved in both AAV-treated groups. At week 8, AAV-Cyp21 + AAV-Cas9 and AAV-Cyp21 mice gained 9.75 g (SD = 2.22) and 13.25 g (SD = 2.58), versus 4.25 g (SD = 1.90) in controls. At week 30, gains remained higher – 6.07 g (SD = 1.10) and 8.93 g (SD = 2.00) – compared to 4.20 g (SD = 3.32) in controls. These results show that AAV-mediated CRISPR/Cas9 delivery enables targeted *Cyp21a1* integration, sustained expression, and partial functional correction. Further optimization of dose, delivery, and editing efficiency is needed. Preliminary data from an ongoing follow-up experiment using adjusted AAV dose suggest improved gene expression and editing efficiency, to be evaluated upon study completion.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-64-00002).

Wheat target genes for CRISPR/Cas9 editing in the post-genomic era

E.A. Salina^{1,2*}, A.A. Kiseleva^{1,2}, E.M. Timonova^{1,2}, Yu.V. Laprina¹, A.V. Kochetov^{1,2}

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

² *Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia*

* salina@bionet.nsc.ru

Key words: common wheat; plant height; yield; gene knockout

CRISPR/Cas9 editing has been developing most intensively for the genomes of agricultural plants in the last 10 years. This is primarily due to overcoming barriers such as genotype-dependent plant regeneration, as well as the expansion of the number of genes associated with agricultural traits. Significant progress in the identification and cloning of target genes of common wheat has been noted since 2018, i.e. since the construction of the first reference map of this genome. The number of isolated genes increased by more than 2 times during this period and reached 172 by the end of 2024, which stimulated the development of work on genomic editing [1]. From the point of view of practical results, it remains important to maintain a balance between genomic editing of the target gene and wheat yield. In this regard, it is interesting to combine knockouts genes, which result in semi-dwarf and high-yielding plants [2].

Plant height is a key agronomic trait in wheat, influencing plant architecture and yield potential. The most widely used alleles in modern breeding are those of the *Rht-1* genes, which are involved in the gibberellin (GA) signaling pathway. Although the semi-dwarf phenotype resulting from the introduction of *Rht-B1b* and *Rht-D1b* alleles reduces lodging, these alleles are also associated with decreased biomass, smaller spikes and grain size, reduced nitrogen use efficiency, and consequently require higher fertilizer inputs to achieve high yields. Recently, *ZnF* genes have been described that function in the signaling pathway of another class of phytohormones, brassinosteroids, and are also associated with plant height regulation. It has been shown that combining knockouts of *Rht-1* and *ZnF* genes can produce semi-dwarf yet high-yielding wheat plants [2].

We used genome editing to create knockouts of *Rht-1* and *ZnF* genes on all three homoeologous chromosomes in the tall common wheat breeding line. More than 200 T0 plants were obtained. A selection is currently underway to identify plants carrying combinations of knockouts in the target genes on different chromosomes, with the goal of evaluating their effects on plant growth and productivity.

Funding: The study is supported by the RSF No. 21-76-30003-II, www.rscf.ru/en/project/21-76-30003/.

References

1. Korchanová Z., Milovanov A., Švec M. et al. Progress and innovations of gene cloning in wheat and its close relatives. *Theor Appl Genet.* 2025;138(5):106
2. Ahmar S., Gruszka D. CRISPR/Cas9 boosts wheat yield by reducing brassinosteroid signaling. *Trends Biochem.* 2023;48(11):917-919

Plasma microRNA profiles in heart transplant recipients with acute rejection: a single-center cohort study

D.B. Sambur*, D.A. Kilina, E.K. Zaikova, L.O. Korneva, M.A. Osipova, A.A. Kostareva, P.A. Fedotov, A.S. Golovkin, O.V. Kalinina

Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

* *sambour-darina@mail.ru*

Key words: microRNAs; cardiac allograft rejection; biomarkers defined by

The aim of this study was to estimate the circulating plasma non-coding RNAs (ncRNA) profile in heart transplant recipients (HTRs) with acute cardiac allograft rejection. The study enrolled 28 HTRs (aged 18-74 years), who underwent heart transplantation in the Almazov National Medical Research Center from 2012 to 2023. A total of 28 plasma samples were collected concurrently with endomyocardial biopsies (EMB), which were performed at time points defined by standard clinical protocols. Transplant rejection (TR) was diagnosed based on histopathological and immunological evaluation of EMB, following current ISHLT grading criteria within 10 years post-transplant. Consequently, four groups were formed: no rejection, cellular rejection, humoral rejection, and patients with TCAD. Small RNA libraries were generated using TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, USA) according to manufacturer's recommendations. Non-coding RNA were detected in all comparison groups and miRNAs being the most represented. Venn diagram showed that there are 73% (317) of miRNAs shared between all groups studied. In the non-rejection and humoral rejection groups, 5% (22) unique miRNAs were identified. Patients with TCAD had 2% (8) unique miRNAs, while patients with cellular rejection had 1% (4). Differential analysis and heat maps did not reveal a clear miRNAs profile for the comparison groups. Significant differences in four miRNAs (hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-5588-5p, hsa-miR-193b-5p, hsa-miR-483-5p) were found between patients without rejection and those with humoral rejection. The obtained results suggest that miRNAs may serve as potential biomarkers for the development of acute humoral rejection. Further verification is required, considering time since heart transplantation.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-15-20016, <https://rscf.ru/project/24-15-20016/>) and was supported by the Saint-Petersburg Science Foundation (project No. 24-15-20016).

Delivery of complexes based on dendronized thiacalix[4]arenes and small RNAs into HeLa tumor cells

A.I. Stanavaya^{1*}, V.M. Abashkin¹, I.E. Shiabiev², P.L. Padnya², I.I. Stoikov², D.G. Shcharbin¹

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Minsk, Belarus

² A.M. Butlerov Chemistry Institute, Kazan Federal University, Kazan, Russia

* alesiastanovaya@gmail.com

Key words: thiacalix[4]arenes; cellular uptake; HeLa tumor cells; siRNA

One of the promising areas of cancer therapy is targeted delivery of genetic material with the help of nanoparticles. In our studies, we used three conformations of thiacalix[4]arenes (*1,3-alternate*, *cone*, and *partial cone*) that have been modified with cationic dendrons of three generations (G1, G2, and G3). These structures were studied as nanocarriers of small RNAs.

The aim of this study was to analyze cellular uptake of dendronized thiacalix[4]arenes and siRNA complexes into HeLa tumor cells using flow cytometry and fluorescence microscopy.

Flow cytometry analysis showed that complexes based on the studied nanoparticles and small RNAs internalized into HeLa cells. In the case of TCA G1 1,3-alt, a high level of cellular uptake was observed – about 80% after 24 hours of incubation at the N:P ratios of 10:1 and 15:1. TCA G2 1,3-alt showed the lowest level of cellular uptake, whereas TCA G3 1,3-alt showed the highest cellular uptake at the N:P ratio of 15:1. Fluorescence microscopy data showed that TCA G1 1,3-alt accumulated in cells after 24 hours of incubation, while in the case of TCA G2 1,3-alt and TCA G3 1,3-alt, no uptake of complexes was detected. TCA G1 Cone also demonstrated a high level of cellular uptake of the complexes after 24 h of incubation at the N:P ratios of 5:1, 10:1 and 15:1. In case TCA G2 Cone, the level of cellular uptake of the complexes was about 50% at the N:P ratio of 15:1 after 24 hours of incubation, while for the third generation compounds it was the lowest. Fluorescence microscopy study showed that only TCA G1 in cone conformation accumulated in HeLa cells. TCA G1 showed a high level of cellular uptake of the complexes (about 90%) was observed at the N:P ratios of 5:1, 10:1, and 15:1 after 24 hours of incubation. TCA G2 PaCo demonstrated a fairly high level of cellular uptake at the N:P ratio of 15:1, while the third generation compounds showed the lowest level of cellular uptake. Fluorescence microscopy images demonstrated that TCA G1 PaCo accumulate in HeLa cells.

Modified thiacalix[4]arenes of *1,3-alternate*, *cone*, and *partial cone* conformations of all three generations accumulate to varying degrees in HeLa cells, but the highest level of cellular uptake was observed for the first generation compounds.

Funding: The study is supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR, Grant No. B23RNFM-041) and by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-43-10005, <https://rscf.ru/en/project/24-43-10005/>).

Genome editing for crop improvement

S.K. Svtashev

Corteva Agriscience, Johnston, IA, USA

** sergei.svtashev@corteva.com*

Key words: CRISPR-Cas technology

CRISPR-Cas mediated genome editing is a powerful technology and has a wide-ranging application in plant breeding. However, despite significant progress and development of new approaches, the efficiency of genome editing depends on various factors including type of genome modification required, plant transformation efficiency, target site availability, etc. At Corteva Agriscience, we combined advanced sequencing technologies, progress in plant transformation of elite germplasm, and new vector design to improve genome editing efficiency. Examples of successful utilization of CRISPR-Cas technology for precision breeding and crop improvement will be discussed.

Amphiphilic dendrons as gene nanocarriers: study of cellular uptake

M.M. Terehova^{1*}, J. Qiu², Z.B. Kvacheva¹, A.G. Poleshko¹, J.-P. Majoral², D.G. Shcharbin¹

¹ *Institute of Biophysics and Cell Engineering, NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

² *Université Toulouse, Toulouse, France*

* *maryja.cierachava@yandex.by*

Key words: amphiphilic dendrons; gene delivery; nanoparticles; cellular uptake

Amphiphilic dendrons are copolymer nanoparticles that consist of a hydrophobic focal group, a branched skeleton and numerous charged terminal groups. Due to their ability to bind various compounds, these dendrons have the potential to become effective nanocarriers in targeted drug delivery, in particular, gene delivery.

It has been shown that phosphorous dendrons of the first generation with maleimide focal groups and pyrrolidine terminal groups are the safest and most biocompatible [1, 2], and were therefore selected for further research. Several cell lines were chosen for this experiment, both cancer and normal. The cancer cell lines were HeLa (cervical cancer), Hep G2 (hepatocellular carcinoma), HT-29 (colorectal adenocarcinoma), RD (rhabdomyosarcoma), A-172 (glioblastoma), CEM-SS (T-cell acute lymphoblastic leukemia), HL-60 (promyelocytic leukemia). To compare with normal cells, the HEK 293T cell line (human embryonic kidney epithelium), rat fibroblasts, and human peripheral blood mononuclear cells were used. FITC-conjugated siRNA was encapsulated by the selected amphiphilic dendrons, and the resulting complexes were delivered into above mentioned cells and then measured by flow cytometry. It has been shown that in normal cells cellular uptake didn't exceed 10%, while for cancer cell lines it was significantly higher: from 15% in RD to 70% in HT-29 cells.

Funding: The study is supported Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, No. B23KUB-013.

References

1. Terehova M.M., Magiera J., Qiu J. et al. Effect of amphiphilic phosphorous dendrons on the conformation, secondary structure, and zeta potential of albumin and thrombin. *Polymer Bull.* 2023;80(8):9181-9193. doi 10.1007/s00289-022-04512-8
2. Terehova M.M., Magiera J., Qiu J. et al. Study of the effect of amphiphilic phosphorous dendrons on blood cells. In: International Scientific Conference "Youth in Science 2024". Minsk, 2024;457-458 (in Belarusian)

Enhancing transformation and genome editing efficiency of commercial barley cultivars using the *GRF4-GIF1* chimera

E.M. Timonova^{1,2*}, A.A. Kiseleva^{1,2}, M.A. Nesterov^{1,2}, A.V. Korotkova¹, A.V. Kochetov^{1,2}, E.A. Salina^{1,2}

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

² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* eegorova@bionet.nsc.ru

Key words: CRISPR/Cas9; barley transformation; gene editing; *GRF4-GIF1*; particle bombardment

Plant genome editing using CRISPR/Cas9 technology has emerged as a promising tool for crop improvement and gene function research. Despite significant advances in barley gene editing, modification of commercial cultivars remains challenging, as traits such as *in vitro* regeneration capacity and *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency are highly genotype-dependent, with few cultivars amenable to transformation. Consequently, the majority of barley genome editing studies have been conducted on the model cv. Golden Promise, known for its high regeneration and transformation capacity.

Recently, developmental regulators genes have demonstrated the ability to promote somatic embryogenesis, thereby facilitating much more effective transformation and genome editing of recalcitrant genotypes. In our study, we tested the capacity of wheat morphogenic regulators *GRF4-GIF1* to influence transformation efficiency and genome editing in three commercial barley cultivars: Tselinny 5, Aley, and G-23035. We used particle bombardment of immature embryos to deliver the JD633 vector containing the *TaGRF4-GIF1* chimera and compared outcomes with the control vector L2_41780, which lacked morphogenic regulators.

Our results demonstrated that the *GRF4-GIF1* gene combination significantly enhances the efficiency of transformation and editing in barley. Using vectors JD633 and L2_41780, we obtained two populations of 27 and 60 T₀ plants, respectively. Notably, stable transformants were exclusively generated in experiments utilizing the JD633 vector (14 out of 27 plants contained vector integration). The efficiency of stable transgenic lines production was approximately 2.8% across all three cultivars, in contrast to 0% for the control vector without *GRF4-GIF1*.

The efficiency of CRISPR/Cas9 editing was verified by targeting the *Nud* gene, which controls naked/hulled grains phenotype. Sequencing analysis identified 5 plants of the Aley, 5 plants of the Tselinny 5 and 4 plants of the G-23035 cultivars exhibiting various mono- and biallelic mutations. Our research thus presents a promising tool for future application of CRISPR technologies for precise improvement directly in commercial barley cultivars.

Funding: This work was done within the framework of State Assignment Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS (№075-15-2025-516 from 30.05.2025).

Centromeric DNA: the storage of genome “black matter” or determinant of centromere species identity?

A.V. Vershinin^{1*}, E.A. Elisafenko^{1,2}, E.V. Evtushenko¹

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

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

* avershin@mcb.nsc.ru

Key words: Centromere; DNA; CENH3/CENP-A; evolution

Centromeres are essential for chromosome segregation because they contain sites for landing kinetochores. Centromeres function to ensure proper distribution of genetic material to daughter cells during cell division, making them critical for genome stability, fertility, and healthy development, yet their DNA sequences evolve rapidly. In most organisms, the key determinant for the site of kinetochore assembly is epigenetic, requiring the deposition to nucleosomes a centromere-specific variant of histone H3 called CENH3 in plants, CENP-A in animals. Centromeres have remained largely underexplored being notoriously difficult to completely assemble due to the highly repetitive DNA sequences and complex structure, so the functional contribution of centromeric DNA to centromere identity remains elusive. Despite their importance, very little was known about the degree to which centromeric DNA share common properties between different species across different phyla. New approaches in genome sequencing and assembly methodology have enabled the gap-less reconstructing of entire eukaryotic chromosomes. Recent developments in long-read sequencing technology have allowed the assembly of centromeric DNA for the first time and have prompted a reassessment of fidelity of centromere function and the evolutionary dynamics of these regions. The mechanisms by which centromeric sequences and chromatin come together to functionally determine the relative fidelity of the centromere regions remains an open question. The report will present data on the molecular structure of centromeres of various eukaryotic species – human, primates, drosophila, cereals – discuss the evolutionary mechanisms of its formation and the possible role of DNA in these processes.

Funding: The study is supported by the Russian Basic-Research Program (project No. 0246-2021-0014) and was funded by the Russian Science Foundation (project No. 24-14-00133).

Genome engineering of CHO cells by multiplex and sequential CRISPR modification: from apoptosis resistance to the production of afucosylated antibodies

I.I. Vorobiev*, N.A. Orlova, M.V. Sinegubova, R.R. Shaifutdinov, D.E. Kolesov

Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* *ptichman@gmail.com*

Key words: CHO; cell engineering; multiplex genome editing

A method for generation of Chinese hamster ovary (CHO) cells with multiple gene knockouts and overexpressions using a minimal number of editing and cloning cycles will enable the creation of platforms for producing therapeutic protein producers with high specific productivity, extended cultivation time, and controlled glycoform composition of target proteins. The development of new cell lines involves the knockout of genes regulating various programmed cell death pathways, stress response, post-translational modifications, and other regulatory and metabolic cellular processes. The practical efficiency of simultaneous multiplex genome editing combined with the introduction of additional copies of housekeeping genes into the CHO genome remains insufficiently studied, but potentially opens the way to engineering cells with radically altered properties for bioreactor cultivation.

As a result of two rounds of CRISPR editing based on the CHO S line, a derivative line CHO 4BGD was obtained with knockouts of the BAK1, BAX, DHFR, and GLUL (GS) genes and overexpression of Bcl-2 and Beclin-1 proteins. This clonal line is characterized by high cell density during prolonged cultivation (up to 20 days), resistance to apoptosis induction, enhanced macroautophagy, and the ability to maintain multistage amplification of plasmids carrying target proteins genes [1]. It was confirmed that derivative producer lines efficiently secrete biosimilar antibodies, Fc-fusion proteins and hormones [2] while retaining these cellular properties.

To generate producers of afucosylated antibodies, the CHO 4BGD line was further modified by knockout of the FUT8 gene using a pair of guide RNAs and selection with lentil lectin. The resulting clones retained key metabolic properties and demonstrated suitability for producing afucosylated glycoproteins. The CHO 4BGD line has been deposited in a public microorganism collection and is freely distributed.

References

1. Orlova N.A., Sinegubova M.V., Kolesov D.E. et al. Genomic and Phenotypic Characterization of CHO 4BGD Cells with Quad Knockout and Overexpression of Two Housekeeping Genes That Allow for Metabolic Selection and Extended Fed-Batch Culturing. *Cells*. 2025;14(10):692. doi 10.3390/cells14100692
2. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V. et al. Increased glycoprotein hormone yield in stably transfected CHO 4BGD cells using heterologous signal peptides in β -chains. *PeerJ*. 2025;13:e18908. doi 10.7717/peerj.18908

Plasma cytokines patterns for non-invasive diagnostic of cardiac allograft rejection: a longitudinal biomarker study

E.K. Zaikova, L.O. Korneva, M.A. Osipova, D.B. Sambur, A.A. Kostareva, P.A. Fedotov, A.S. Golovkin, O.V. Kalinina*

Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

*olgakalinina@mail.ru

Key words: cytokines; cardiac allograft rejection; biomarkers

Heart transplant rejection (HTR) continues to pose significant clinical challenges, partly due to the absence of reliable non-invasive biomarkers. The aim of this study was to investigate longitudinal cytokine patterns in HT recipients and assess their diagnostic potential for myocardial rejection.

The study enrolled 84 heart transplant recipients (aged 18-74 years), who underwent heart transplantation in the Almazov National Medical Research Center from 2012 to 2023. A total of 98 plasma samples were collected concurrently with endomyocardial biopsies (EMB), which were performed at time points according to standard clinical protocols. Out of 32 plasma samples were obtained from recipients within 1 year post-transplantation (PT), 40 were obtained during 1-5 years PT, and 37 were obtained > 5 years PT. Transplant rejection (TR) was diagnosed based on histopathological and immunological evaluation of EMB, following current ISHLT grading criteria. Plasma concentrations of 46 cytokines were investigated using multiplex analysis.

During the first year, PT recipients with HTR showed significantly elevated levels of IFN- γ , IL-12p40, M-CSF, MIP-1 β , TGF- α , and TNF- α compared to those without HTR. Plasma cytokine profiling identified a 13-cytokine signature for HTR (Wilks' $\lambda = 0.04029$, approx. $F(26,56) = 8.5771$, $p < 0.000$). In the 1-5 year PT period, rejection-associated cytokines included sCD40L, IL-1a, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF α , TNF β , VEGF-A; and 36 cytokine panel demonstrated strong discriminatory power for HTR (Wilks' $\lambda = 0.0000$, approx. $F(72.4) = 96,809$, $p < 0.002$). Notably, while comprehensive univariate analysis revealed no significant differences in individual cytokine levels between recipients with and without HTR beyond 5 years PT, multivariate discriminant analysis identified a 27-cytokine signature capable of stratifying late-phase rejection (Wilks' $\lambda = 0.00057$, $F(54,14) = 10.59$, $p < 0.0001$). Our findings demonstrate that longitudinal plasma cytokine profiles represent promising non-invasive biomarkers for monitoring heart transplant rejection across long-term follow-up of recipients.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-15-20016, <https://rscf.ru/project/24-15-20016/>) and was supported by the Saint-Petersburg Science Foundation (project No. 24-15-20016).

How a tumor cell responds to the shutdown of one or several pro-oncogenic microRNAs

M.A. Zenkova*, S.K. Miroshnichenko, O.A. Patutina

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

* marzen@ibio.ru

Key words: microRNAs; antisense oligonucleotide; cancer cell; proteomic analysis

The global pursuit of targeted oncotherapeutics has increasingly focused on modulating oncogenic microRNAs. Our contribution to this field is the development of a novel class of mesyl phosphoramidate oligonucleotides (μ -ASOs) targeting miR-21, miR-17, and miR-155. This work sought to unravel the fundamental cellular consequences of their application. We found that these compounds act as precise molecular keys, initiating a profound intracellular reprogramming. Their exceptional nuclease resistance and unique capacity to recruit RNase H facilitate efficient and sustained target silencing, reducing miRNA levels by 50–75%. This primary trigger sets off a cascade: the subsequent restoration of pivotal tumor suppressor proteins, such as PTEN and PDCD4, orchestrates a comprehensive anti-tumor response. This is functionally manifested as a 3 fold induction of apoptosis, a 7 fold suppression of cell migration, and up to an 8 fold inhibition of tumor growth in vivo. The therapeutic narrative becomes even more compelling when these agents are used in combinatorial regimens which unlock potent synergy, driving the efficacy to new heights.

To deconstruct this reprogramming at a systems level, we conducted a deep proteomic analysis of Caco-2 cells 72 h post-transfection. Crucially, the mesyl modification itself showed no nonspecific off-target effects on the proteome. Instead, each μ -ASO elicited a distinct and specific molecular signature. Suppression of miR-17 predominantly altered the expression of proteins governing cell proliferation and the chaperone response. Inhibition of miR-155 modulated targets involved in apoptosis, immune response, and nucleocytoplasmic transport. The most pleiotropic impact was observed with the miR-21-directed μ -ASO, which significantly affected proteins regulating apoptosis, cell cycle, proliferation, adhesion, and DNA repair. The combination of μ -ASOs affected a similar broad spectrum of functions – proliferation, adhesion, and DNA replication/repair – yet achieved this through an entirely nonoverlapping set of molecular targets, suggesting a powerful and convergent phenotypic response.

Ultimately, our findings illustrate that μ -ASOs do not merely inhibit a single target; they rewire the oncogenic circuitry of the cell through a cascade of specific molecular events, offering a powerful, sophisticated, and well-tolerated strategy for cancer therapy.

Funding: The study was supported by Russian Science Foundation grant No. 19-74-30011.

Base editors: past, present, future

D.O. Zharkov

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

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

dzharkov@lbio.ru

Key words: Cas9; base editors; DNA deaminases; DNA glycosylases; epigenetics

The breakthrough technology of genome editing has dramatically reshaped the field of molecular and cellular biology over the past ten years and is set to enter the healthcare industry, with the first therapy, exagamglogene autotemcel (Casgevy), approved in 2023. Based on the natural bacterial anti-phage CRISPR system and built on earlier technologies that used designer zinc finger nucleases and TAL effector nucleases, the first generation of genome editing tools relied on introducing double-stranded breaks by RNA-targeted Cas9 nuclease followed by error-prone repair via non-homologous end-joining or error-free replacement via homologous recombination. The technology was soon improved by the development of more precise engineered Cas9 versions, introduction of Cas12 targeting modules and, more recently, the appearance of base editors, in which a catalytically dead Cas9 targeting part (dCas9) is fused to an effector module, such as cytosine deaminase, which selectively modifies nucleobases within a structure-defined editing window.

The first base editors were based on natural cytosine deaminases of the AID/APOBEC family and converted cytosine to uracil, with the intent to cause dAMP misincorporation and ultimately, a C>T (G>A) transition mutation. It became apparent immediately that cellular DNA repair systems counteract this type of targeted DNA damage, so the next addition to the system was a specific viral protein (Ugi) that inhibits uracil repair. Engineered versions of tRNA adenosine deaminase were used to obtain base editors converting A to hypoxanthine with wider mutation spectra. The later generation of base editors additionally fused specific DNA glycosylases to dCas9 to facilitate the appearance of a non-instructive abasic site and further increase the mutation range. Finally, engineered DNA glycosylases were used that can excise normal nucleobases and do not need the deamination module at all. To narrow the editing window and decrease off-target effects, “split” architectures were developed, in which the functional module is inserted between Cas9 domains.

In addition to editing the sequence of genomic DNA *in situ*, fusion of functional modules to Cas9 allow installing and erasing epigenetic modifications such as 5-methylcytosine (mC) and 5-hydroxymethylcytosine (hmC) to regulate gene activity. The functional modules used for this purpose include DNA–cytosine–C5-methyltransferases, TET family dioxygenases, and DNA glycosylases specific either to oxidized/deaminated mC derivatives (TDG) or to mC/hmC themselves (plant DML/ROS proteins).

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation, No. 21-64-00017p.

Постерные доклады

Posters

Потенциал модифицированных каталитически неактивных эндонуклеаз Cas9 для прижизненной визуализации локусов ДНК

Г.А. Абушинова^{1*}, В.В. Жердева², Л.Г. Малошенок^{1**}

¹ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

* gerelabushinova@yandex.ru

** maloshenoklg@gmail.com

Ключевые слова: dCas9-ортологи; флуоресцентные белки; прижизненная визуализация; FRET; sgRNA

Potential of modified catalytically inactive Cas9 endonucleases for intravital imaging of DNA loci

G.A. Abushinova^{1*}, V.V. Zherdeva², L.G. Maloshenok^{1**}

¹ Institute of general genetics RAS, Moscow, Russia

² Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the RAS, Moscow, Russia

* gerelabushinova@yandex.ru

** maloshenoklg@gmail.com

Key words: dCas9 orthologs; fluorescent proteins; live-cell imaging; FRET; sgRNA

Существующие методы, основанные на фиксации клеток и сшивке ДНК, позволяют определить пространственное расположение геномных локусов, но не дают возможности отслеживать их динамику в живых клетках. Мы разработали альтернативный подход на основе dCas9-FP, для прижизненной визуализации и оценки расстояния между локусами методом FRET. Созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие гены различных ортологов dCas9 (*S. pyogenes*, *N. meningitidis*, *S. thermophilus*), связанные через линкер с FP под управлением индуцибельного промотора, что снижало цито- и фототоксичность. Выбор флуоресцентных белков базировался на их биофизических свойствах для формирования донор-акцепторных FRET-пар. Также были созданы конструкции sgRNA для мечения последовательностей с различным числом повторов: теломеры (>500 повторов), а также амплифицированные онкогены MUC4 и EGFR (~90 повторов). В клеточной линии MNNGHOS получены стабильные клоны, экспрессирующие пары и одиночные варианты dCas9-FP. Скорость формирования химерных белков, их фолдинг, ядерный импорт и субклеточное распределение существенно различались в зависимости от комбинации флуоресцентного белка и ортолога dCas9. В ряде случаев медленный фолдинг или задержка ядерного транспорта вызывали дисбаланс уровней донора и акцептора, что снижало эффективность FRET-системы. Анализ времени жизни флуоресценции выявил наиболее эффективные FRET-пары: EGFP/mCherry, mNeonGreen/mCherry и mClover3/mRuby3. При таргетировании обеих химер на теломерные последовательности время жизни донора изменялось в широком диапазоне: от значений, характерных для FRET-взаимодействия, до контрольных значений без FRET. Эти данные подтверждают возможность прижизненной регистрации пространственной близости локусов.

Финансирование: грант РНФ No. 22-14-00205 и государственное задание ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», No. 125040704886-1.

Разработка системы для оценки точности геномного редактирования на основе мутагенеза в гене *rpoB* *Escherichia coli*

М.М. Аманова, И.П. Вохтанцев, Д.О. Жарков*

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

* oxoguanine@gmail.com

Ключевые слова: *rpoB*; CRISPR/Cas9; специфичность

Development of a system for evaluating genome editing accuracy based on mutagenesis in the *rpoB* gene of *Escherichia coli*

M.M. Amanova, I.P. Vokhtantsev, D.O. Zharkov*

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

* oxoguanine@gmail.com

Key words: *rpoB*; CRISPR/Cas9; genome editing accuracy

Одна из главных задач при работе с системой CRISPR/Cas9 – это повышение ее специфичности. Есть два пути решения этой задачи: направленная эволюция и рациональный дизайн. Метод направленной эволюции основан на многократном отборе по определенному свойству из рандомизированных библиотек. Для использования рационального дизайна необходимы знания о структуре белка. Изменяя аминокислотную последовательность, можно получить варианты с разной субстратной специфичностью и каталитической активностью.

В ИХБФМ СО РАН методом рационального дизайна создаются варианты белка Cas9 с повышенной специфичностью. Для их первичной оценки была создана система оценки точности геномного редактирования на основе мутагенеза в гене *rpoB* *E. coli*.

Ген *rpoB* кодирует бета-субъединицу РНК-полимеразы. Так как точечные мутации в бета-субъединице вызывают устойчивость к рифампицину, форвард-мутагенез в гене *rpoB* широко применяется для оценки действия мутагенов на клетки [1]. Селекцией на устойчивость к рифампицину были отобраны 11 мутаций в гене *rpoB* в 5 штаммах *E. coli* (XL1-Blue, CC104, BL21(DE3), SIJ488, DH5 α). На их основе сконструированы 2 панели изогенных штаммов *E. coli* (SIJ488, DH5 α), каждый из которых несет мутацию вблизи от последовательности 5'-NGG-3', узнаваемую ферментом SpCas9 как мотив, соседствующий с протоспейсером. С использованием этой системы была оценена точность и эффективность действия белка SpCas9 дикого типа и его вариантов с предсказанной повышенной специфичностью узнавания последовательности протоспейсера.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 21-64-00017п.

Список литературы

1. Garibyan L., Huang T., Kim M. et al. Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair*. 2003;2(5):593-608. doi 10.1016/s1568-7864(03)00024-7

Подбор оптимальной вирус-опосредованной доставки генов в кардиомиоциты человека, полученные из ИПСК условно здорового донора

С.К. Андрианова^{1,2*}, В.С. Овечкина^{1,3}, В.В. Белоусов^{1,3,4}, А.А. Можаяев^{1,2,3,4}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

* skandrianova@edu.hse.ru

Ключевые слова: ИПСК; доставка генов; AAV-векторы

Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transgene delivery in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from phenotypically normal donors

S.K. Andrianova^{1,2*}, V.S. Ovechkina^{1,3}, V.V. Belousov^{1,3,4}, A.A. Mozhaev^{1,2,3,4}

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

² National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

* skandrianova@edu.hse.ru

Key words: iPSC; gene delivery; AAV vectors

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют собой удобную платформу для изучения и моделирования различных заболеваний, а также тестирования терапевтических средств. Направленная дифференцировка ИПСК в кардиомиоциты позволяет исследовать электрофизиологические и метаболические особенности этих клеток, а также изучать патологии сердечно-сосудистой системы. Однако доставка трансгенов в полученные из ИПСК кардиомиоциты стандартными методами, такими как липофекция или электропорация, является малоэффективной. Альтернативой традиционным физическим и химическим методам доставки может служить использование векторов на основе AAV, которые не способны встраиваться в геном в отличие от лентивирусов, обеспечивают длительную экспрессию трансгена и обладают разной тропностью к клеткам и тканям. В данной работе мы исследуем эффективность доставки трансгенов в ИПСК-кардиомиоциты с помощью AAV различных серотипов, включая стандартные 1 и 9, а также новые – DJ и php.S.

В работе была проведена направленная дифференцировка ИПСК от здорового донора в кардиомиоциты. Зрелые клетки были трансдуцированы конструкциями на основе AAVs различных серотипов, несущими зеленый флуоресцентный белок GFP под кардиоспецифичным промотором cTnT. Дальнейший количественный анализ клеток показал, что при трансдукции кардиомиоцитов *in vitro* серотипы DJ и 1 обладают сравнительно одинаковой эффективностью при этом у серотипа php.S наблюдались самые низкие показатели эффективности.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-75-10111 (https://rscf.ru/prjcard_int?23-75-10111).

Генная терапия гемофилии Б на основе синтетических AAV векторов

В.В. Артемьев^{1,2*}, С.Г. Феоктистова^{1,2}, О.Н. Митяева^{1,2}, П.Ю. Волчков^{1,2,3}

¹ *Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

² *Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Россия*

³ *Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова, Москва, Россия*

* *artemev.vv@phystech.edu*

Ключевые слова: гемофилия Б; генная терапия; AAV вектора

Gene therapy of hemophilia B based on synthetic AAV vectors

V.V. Artemyev^{1,2*}, S.G. Feoktistova^{1,2}, O.N. Mityaeva^{1,2}, P.Yu. Volchikov^{1,2,3}

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

² *Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russia*

³ *Moscow Clinical Scientific Center N.A. A.S. Loginov, Moscow, Russia*

* *artemev.vv@phystech.edu*

Key words: hemophilia B; gene therapy; AAV vectors

Гемофилия Б – X-сцепленное рецессивное заболевание, вызываемое мутациями в гене F9. Мутации приводят к нарушениям свертываемости крови. Генная терапия гемофилии Б, использующая аденоассоциированный вирусный вектор для доставки функциональной копии гена F9, является перспективным направлением исследований. С целью создания best-in-class терапии была проведена работа по оценке эффективности генной терапии гемофилии Б на мышинной модели двумя различными синтетическими векторами (sAAV) при двух различных дозировках вектора (d1 и d2).

Введение вектора sAAV2 приводило к коррекции гемофилии Б в обеих исследуемых группах, в то время как активность в контрольных группах соответствовали здоровому фенотипу и фенотипу гемофилии Б. Уровень экспрессии и вирусная нагрузка были значительно выше в группах с вектором sAAV2 в сравнении с группами серотипа sAAV1. Полученные результаты свидетельствуют о большей эффективности векторов на основе синтетического серотипа sAAV2 для генной терапии гемофилии Б на мышинной модели в сравнении с серотипом sAAV1. Лучшая эффективность экспрессии наблюдается при меньшей дозировке вектора в группе sAAV d1 при сохранении терапевтического эффекта. Чрезвычайно высокие показатели прокоагулянтной активности предполагают дальнейшее применение меньших дозировок векторов для снижения вирусной нагрузки на организм и повышения безопасности разрабатываемой генной терапии гемофилии Б.

Финансирование: Исследование поддержано Минобрнауки и высшего образования РФ, соглашение № 075-03-2025-662.

Церийсодержащий октакальциевый фосфат с люминесцентными свойствами для медицинского применения

О.В. Баранов, Ю.О. Зобкова, Н.В. Петракова*, А.А. Егоров, А.Ю. Федотов, В.С. Комлев
*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения
им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия*
* *petrakova.nv@mail.ru*

Ключевые слова: октакальциевый фосфат; церий; люминесценция; биоматериалы

Synthesis and study of luminescent properties of cerium-containing octacalcium phosphate for medical application

O.V. Baranov, Yu.O. Zobkova, N.V. Petrakova*, A.A. Egorov, A.Yu. Fedotov, V.S. Komlev
A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
* *petrakova.nv@mail.ru*

Key words: octacalcium phosphate; cerium; luminescence; biomaterials

Благодаря сходству с неорганической составляющей костей и зубов, фосфаты кальция (ФК) демонстрируют превосходную биосовместимость и биоактивность, что обосновывает их широкое применение для восстановления поврежденной костной и зубной ткани. В последнее время среди ФК все большее внимание уделяется октакальциевому фосфату (ОКФ), который считается прекурсором биоапатита вследствие структурного сходства и способности к трансформации в апатит в условиях *in vivo* [1]. Включение катионов церия (Ce^{3+}) в состав ОКФ позволит придать материалу не только ряд полезных терапевтических свойств, таких как антибактериальная и антиоксидантная активность, но также использовать его в диагностических целях вследствие способности церия к люминесценции в УФ области спектра [2].

Таким образом, целью данной работы было получение церийсодержащего ОКФ (Ce-ОКФ) с концентрацией ионов Ce 0.5, 1, 5 и 10 мол. % относительно атомов Ca. Установлено ингибирующее воздействие ионов церия на рост кристаллов ОКФ при синтезе методом гидролиза дикальцийфосфата дигидрата в буферном растворе ацетата натрия. Показано, что при облучении источником света с длиной волны 270 нм, порошки Ce-ОКФ проявляют люминесценцию в УФ диапазоне, характерную для люминесценции ионов Ce^{3+} (350-380 нм, электронный переход $2F_{5/2}$), интенсивность которой растет с увеличением содержания церия в материалах.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда, № 23-63-10056.

Список литературы

1. Suzuki O. Evolution of octacalcium phosphate biomaterials. In Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Octacalcium Phosphate Biomaterials. Woodhead Publ., 2020;1-15. doi 10.1016/B978-0-08-102511-6.00001-7
2. Petrakova N.V., Zobkova Yu.O., Komlev V.S. et al. Synthesis and characterization of luminescent cerium-doped hydroxyapatite. *Ceramics Int.* 2024;50(12):20905-20916. doi 10.1016/j.ceramint.2024.03.093

In vitro модель на основе клеток человеческой дефинитивной энтодермы для исследования патогенеза болезни Вильсона–Коновалова

М.А. Берестовой^{1,2*}, В.Д. Стародубова², Е.В. Карпухина², А.С. Баранова², А.В. Иваненко², А.Г. Шохина^{1,2}

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

² Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

* berestovoy@fccps.ru

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова; АТР7В; перегрузка медью; дефинитивная энтодерма; клеточная модель

Human definitive endoderm-based *in vitro* model for studying the pathogenesis of Wilson disease

M.A. Berestovoy^{1,2*}, V.D. Starodubova², E.V. Karpukhina², A.S. Baranova², A.V. Ivanenko², A.G. Shokhina^{1,2}

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

* berestovoy@fccps.ru

Key words: Wilson disease; ATP7B; copper-overload cirrhosis; definitive endoderm; cell model

Болезнь Вильсона-Коновалова – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное нарушением метаболизма меди в организме. Патогенез заболевания связан с мутациями в гене АТР7В, кодирующем медь-транспортирующую АТФазу. Существующие клеточные модели ограничены генетической нестабильностью и низкой пролиферацией. Модель на основе клеток дефинитивной энтодермы (ДЭ) может устранить эти ограничения, упростить и удешевить исследование болезни.

Целью работы является разработка *in vitro* модели на основе клеток человеческой ДЭ, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), для исследования патогенеза болезни Вильсона-Коновалова и поиска новых методов медикаментозного лечения. Процесс создания модели включал: 1) дифференцировку ИПСК в присутствии активина А и СНIR99021; 2) моделирование перегрузки медью путем добавления экзогенной меди в ростовую среду; 3) оценку относительной выживаемости клеток с помощью красителя Alamar Blue.

Клетки ДЭ демонстрировали характерный фенотип и экспрессировали маркеры SOX17, FOXA2 и АТР7В. Полученная модель демонстрировала чувствительность к перегрузке экзогенной медью с IC₅₀ - 197 мкМ.

Созданная платформа на основе клеток ДЭ, полученных из ИПСК здорового донора, позволяет моделировать перегрузку меди *in vitro*, имитируя нарушение ее клеточного метаболизма при болезни Вильсона-Коновалова. Модель преодолевает ограничения иммортализованных культур, и первичных, а также дифференцированных из ИПСК, гепатоцитов. Однако неполная зрелость клеток ДЭ остается ограничением. Будущие исследования могут включать использование 3D систем ко-культивирования для повышения зрелости и моделирования межклеточного взаимодействия различных типов клеток в печени.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 24-74-10106.

Современные подходы к созданию репортерных клеточных линий с помощью CRISPR-направленной вставки трансгена в безопасные и эндогенные локусы

А.Г. Быконя^{1*}, Д.Ю. Гушчин¹, Н.А. Барлев², А.В. Звягин¹

¹ Научный центр трансляционной медицины, Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

² Кафедра биомедицинских наук, Медицинская школа, Университет Назарбаева, Астана, Казахстан

* bykonya.ag@talantiuspeh.ru

Ключевые слова: CRISPR; скрининг лекарственных препаратов; безопасные локусы; репортерные клеточные линии

Modern approaches to engineering human reporter cell lines using CRISPR within Safe Harbor loci and endogenous genes

A.G. Bykonya^{1*}, D.Y. Guschin¹, N.A. Barlev², A.V. Zvyagin¹

¹ Department of translational medicine, Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

² Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

* bykonya.ag@talantiuspeh.ru

Key words: CRISPR; drug screening; safe harbor loci; reporter cell lines

Репортерные клеточные линии приобретают все большую популярность в современной молекулярной биологии, поскольку они обеспечивают надежный и четкий сигнал для различных типов анализов, как *in cellulo*, так и *in vivo*. Создание репортерных клеточных линий играет ключевую роль в скрининге активаторов и ингибиторов сигнальных путей для разработки новых терапевтических подходов. Репортерные клеточные линии – это линии со стабильно интегрированными репортерными конструкциями, содержащими сигнальные гены (часто люциферазы или флуоресцентные белки), что позволяет визуализировать и отслеживать экспрессию белков. Несмотря на кажущуюся безопасность и простоту использования, нецелевая геномная интеграция репортерных генов может серьезно повлиять на экспрессию соседних генов, вызывая нежелательные и непредсказуемые эффекты. В отличие от нецелевого подхода, система CRISPR/Cas9 обеспечивает более точный метод интеграции репортерных генов, особенно при интеграции репортерных генов в локусы Safe Harbor. Это гарантирует минимальное влияние на соседние геномные области. Мы рассматриваем последние достижения в создании репортерных линий с использованием системы CRISPR/Cas9 и экспериментальные подходы к идентификации подходящих локусов Safe Harbor для создания собственной репортерной клеточной линии, демонстрирующей эффективность TGF-beta ингибиторов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00075) и FDCRGP grant #2012022FD41 from Nazarbayev University.

CD71-опосредованные транспортные системы на основе ферритина для селективной доставки лекарственных препаратов к опухолевым клеткам крови человека

Ю.М. Гармаза¹, Н.В. Гончарова¹, О.Л. Пашкова¹, В.К. Гаспарян², А.В. Тамашевский^{1*}

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА, Ереван, Армения

* tayzoe@gmail.com

Ключевые слова: гликоконъюгаты ферритина; трансферриновый рецептор 1; Т-, В-лимфоциты; жизнеспособность

CD71-mediated ferritin-based transport systems for selective drug delivery to human blood tumor cells

Y.M. Harmaza¹, N.V. Goncharova¹, O.L. Pashkova¹, V.K. Gasparyan², A.V. Tamashevski^{1*}

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

² Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia

* tayzoe@gmail.com

Key words: ferritin glycojugates; transferrin receptor 1; T-, B-lymphoblasts; viability

Для достижения эффективных терапевтических результатов при лечении опухолевых заболеваний крови актуальной представляется селективная доставка лекарственных соединений внутрь клетки, минимизирующая при этом системную цитотоксичность. По этой причине все более растет интерес к разработке селективных систем доставки лекарств (СДЛ). В последние годы конъюгаты ферритина занимают центральное место в качестве СДЛ за счет хорошей биоразлагаемости, способности накапливаться в сильно васкуляризованных железозависимых опухолях и интернализации опухолевыми клетками через трансферриновый рецептор 1 (CD71).

Целью данной работы являлось выявление апоптотического действия транспортных систем на основе гликоконъюгатов ферритина (его полый наночастицы – апоферритина) при селективной доставке лекарственных препаратов, используемых в клинике (дексаметазон и винкристин), к опухолевым Т- и В-клеткам крови в эксперименте *in vitro* и изучение роли CD71 рецептора в данном процессе.

В результате выполнения исследования, выявлены гликоконъюгаты, которые обладают высокой эффективностью загрузки и свойствами контролируемого высвобождения лекарственного соединения. Установлено, что процесс слияния транспортной системы на основе апоферритина с клеткой происходит по пути эндоцитоза, опосредованного CD71, а в дальнейшем развитии апоптоза в клеточных опухолевых культурах IM-9/MOLT-4 ключевая роль принадлежит редокс-дисбалансу. Более того, в работе проведены сравнительные исследования действия наноконъюгатов на периферические мононуклеарные клетки крови здоровых доноров, которые являются низкоэкспрессирующими CD71 антиген.

Финансирование: Исследование поддержано международным грантом Беларусь-Армения M21APMG-003 и НИР 3.05.2 ГПНИ «Конвергенция-2025».

Использование бактериальных аргонавтов для изучения конфликтов транскрипции и репликации

Б.К. Годнеева*, В.А. Пантелеев*, А.В. Кульбачинский**, Д.М. Гельфенбейн***

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

** авторы внесли равный вклад*

*** avkulb@yandex.ru*

**** es_dar@inbox.ru*

Ключевые слова: аргонавты; транскрипция; репликация; двунитевые разрывы ДНК; РНКазы Н

Using bacterial Argonaute to study transcription-replication conflicts

B.K. Godneeva*, V.A. Panteleev*, A.V. Kulbachinskiy**, D.M. Gelfenbein***

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

** equal contribution*

*** avkulb@yandex.ru*

**** es_dar@inbox.ru*

Key words: Argonaute proteins; transcription; replication; double-strand breaks; RNase H

Во всех делящихся клетках неизбежны конфликты транскрипции и репликации, так как оба процесса происходят на одной молекуле ДНК. Нарушение этого баланса приводит к возникновению структурных повреждений ДНК, включая образование R-петель и одно- и двунитевых разрывов. В работе мы исследовали механизмы этих конфликтов на модели *Escherichia coli* и их влияние на стабильность генома.

Для выявления участков активного процессинга ДНК применен подход с использованием бактериальных белков-Аргонавтов, способных связывать короткие фрагменты ДНК, образующиеся в местах двунитевых разрывов. Создана серия модифицированных штаммов *E. coli*, экспрессирующих белок-Аргонавт, с различной ориентацией индуцибельных генов и делециями факторов репарации. Полученные штаммы выращены в различных условиях для индукции конфликтов транскрипции и репликации, проведено выделение белков-Аргонавтов и ассоциированных с ними нуклеиновых кислот. Секвенирование и анализ распределения по геному связанных с Аргонавтами фрагментов ДНК позволили выявить участки локальной деградации ДНК.

Полученные данные показали, что столкновения транскрипционных и репликационных комплексов приводят к накоплению повреждений ДНК, которые могут быть детектированы с использованием Аргонавтов. Особенно выраженный эффект наблюдался при делеции РНКазы Н: в этих условиях разрывы фиксировались не только при встречной, но и при сонаправленной транскрипции, в частности в активно транскрибируемых рРНК-оперонах. Это подчеркивает важную роль РНКазы Н в предотвращении формирования R-петель и поддержании стабильности генома.

Таким образом, транскрипция может выполнять как защитную функцию, способствуя привлечению факторов репарации, так и провоцировать повреждения ДНК при нарушении ее координации с другими процессами. Бактериальные белки-Аргонавты позволяют локализовать участки нестабильности в геноме и могут быть использованы для детекции процессинга ДНК в бактериальной клетке.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FFEW-2024-0009).

Получение и анализ клеточных линий MNNG/HOS с нокаутом гена *PBOV1* с помощью системы CRISPR-Cas9

Е.А. Гук*, В.Е. Спангенберг, С.А. Брускин, Л.Г. Малошенок

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* *lissa.guk21@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-Cas; нокаут; онкогенез

Preparation and analysis of MNNG/HOS cell lines with *PBOV1* gene knockout using the CRISPR-Cas9 system

E.A. Guk*, V.E. Spangenberg, S.A. Bruskin, L.G. Maloshenok

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* *lissa.guk21@gmail.com*

Key words: CRISPR-Cas; knockout; oncogenesis

Злокачественные новообразования ежегодно выявляются более чем у десяти миллионов человек во всем мире. Генетические маркеры являются одним из наиболее эффективных инструментов для ранней диагностики рака. Ген человека *PBOV1*, биологическая функция которого пока не установлена, демонстрирует стабильную экспрессию при ряде злокачественных опухолей. Целью работы являлась оценка вклада *PBOV1* в изменение фенотипа и профилей экспрессии генов, характерных для клеточной линии остеосаркомы MNNG/HOS. Секвенирование ампликона целевого участка гена показало наличие делеций длиной 7, 11 и 16 нуклеотидов во всех аллелях полиплоидной линии MNNG/HOS, что вызвало сдвиг рамки считывания и преждевременное формирование стоп-кодонов, подтверждая полный нокаут гена. Экспрессию *PBOV1* оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени; также анализировали изменения экспрессии генов-маркеров рака. Скорость пролиферации и миграционной активности определяли методом «зарастания царапины». Организацию виментина, показателя онкогенного потенциала клеток, изучали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. В результате экспрессия *PBOV1* в линиях с нокаутом полностью отсутствовала по сравнению с клетками дикого типа. Удаление *PBOV1* снижало уровень маркера пролиферации *CDK9* и онкогенов *Nanog*, *Sox2*, *ERBB2*, одновременно повышая экспрессию опухолевого супрессора *TP53*. Пролиферация снижалась в несколько раз, а миграция полностью отсутствовала. Иммуноокрашивание показало переход от фибриллярной формы виментина вокруг ядра в клетках дикого типа к агрегатной форме в клетках с нокаутом, что соответствует деградации виментина. Таким образом, нокаут гена *PBOV1* методом CRISPR-Cas9 значительно снижает онкогенный потенциал клеточной линии остеосаркомы MNNG/HOS, уменьшая пролиферативную и миграционную активность клеток.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.

Врач-генетик как связующее звено между пациентом и молекулярной терапией наследственных заболеваний

Н.М. Двойнова

ФГБНУ «НИИ АГП им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

l.cosulya@gmail.com

Ключевые слова: генетическое консультирование; наследственные заболевания; репродуктивный выбор; генная терапия; таргетная терапия

Medical geneticist as a link between the patient and molecular therapy of hereditary diseases

N.M. Dvoynova

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

l.cosulya@gmail.com

Key words: genetic counseling; hereditary diseases; reproductive choice; gene therapy; targeted therapy

Современное медико-генетическое консультирование (МГК) семей с высоким риском рождения ребенка с наследственным заболеванием требует не только точной диагностики, но и глубокого этического и клинического анализа доступных репродуктивных опций. Сложности консультирования касаются как интерпретации молекулярно-генетических данных, так и выстраивания коммуникации в условиях неопределенности диагноза или прогноза.

Предоставление репродуктивного выбора, включая ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием, инвазивную пренатальную диагностику, использование донорского материала, суррогатное материнство или усыновление, сопряжено с необходимостью обсуждать не только риски передачи заболевания, но и перспективы лечения. Наличие доступной таргетной или генной терапии может принципиально повлиять на репродуктивные решения семьи. Наличие одобренных препаратов способно изменить акцент консультации: пациенты могут рассмотреть рождение ребенка с перспективой последующего лечения.

В этом контексте необходимо интегрировать знания о текущем статусе и перспективах высокотехнологичных методов лечения, в том числе проводимых клинических испытаниях, в консультативную практику. Однако такие подходы по-прежнему ограничены высокой стоимостью препаратов, ограниченным числом профильных центров и неравноценной региональной доступностью, а также недостаточной информированностью семей.

Рекомендуется обсуждать наличие потенциального лечения на всех этапах консультирования – при выявлении генных вариантов на прекоцепционном скрининге, во время пренатальной диагностики и после постановки диагноза. В то же время существует дефицит унифицированных рекомендаций по коммуникации с такими семьями в контексте лечения, основанного на передовых технологиях.

Таким образом, формирование этически обоснованных и клинически релевантных стратегий МГК, интегрирующих возможности прецизионной терапии, остается актуальной задачей для трансляционной генетики.

Финансирование: поддержано грантом БРК от 29.05.2025 года № 075-15-2025-478.

Нуклеаза Cas12f1 как перспективный инструмент для направленных геномных интеграций

А.Д. Золотаренко, В.В. Шептий, С.А. Брускин*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* *brouskin@vigg.ru*

Ключевые слова: Cas12f1; геномное редактирование; HDR; направленная интеграция

Cas12f1 nuclease: a versatile platform for targeted genomic integrations

A.D. Zolotarev, V.V. Sheptiy, S.A. Bruskin*

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* *brouskin@vigg.ru*

Key words: Cas12f1; genome editing; HDR; targeted integration

Одной из наиболее важных задач в геномном редактировании является внесение нужных последовательностей ДНК в целевые сайты генома. Нуклеазы CRISPR/Cas, генерирующие липкие концы, обеспечивают высокоточную вставку ДНК за счет направленной комплементарности. В отличие от Cas9, образующей при редактировании тупые концы, ферменты типа Cas12a/Cas12f образуют 5'-липкие концы с выступающими одноцепочечными участками длиной 4-7 пн. Это увеличивает эффективность гомологично-зависимой репарации (HDR) в 3–5 раз и снижает нецелевые вставки, основанные на негомологичном восстановлении концов. Применение таких систем позволяет осуществлять бесшовное слияние фрагментов ДНК без применения дополнительных линкеров, собирать сложные кассеты в безопасных локусах (AAVS1) с высокой эффективностью, интегрировать трансгены с высокой точностью при создании CAR-T-клеток.

В данной работе оценивался потенциал компактной нуклеазы Cas12f1, образующей при редактировании липкие концы, для интеграции коротких либо протяженных донорных матриц. Преимуществом данной нуклеазы по сравнению с другими является ее небольшой размер, который позволяет осуществлять ее упаковку в AAV частицы.

В работе были созданы два варианта конструкций: небольшие доноры с липкими концами с плечами гомологии в 5 пн либо кассеты, кодирующие ген флуоресцентного белка, с плечами гомологии размером 400 пн. Эксперименты на клетках HEK293 по редактированию нуклеазой Cas12f1 в присутствии донорных матриц показали эффективную интеграцию как небольших, так и протяженных последовательностей, что подтверждалось микроскопией, ПЦР и ПЦР в реальном времени. Анализ эффективности интеграций небольших доноров путем высокопроизводительного секвенирования ампликонов (Ampliseq) показал, что их интеграция в целевые сайты происходила с высокой точностью.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о возможности применения нуклеазы Cas12f1 для решения различных задач молекулярной биологии и генной терапии: от коррекции точечных повреждений ДНК до интеграции протяженных терапевтических кассет.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.

Использование систем CRISPR-активации для разработки противовирусных препаратов

И.В. Карандашов^{1,2*}, А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин^{1,2}, А.С. Фролова¹, А.С. Тихонов¹, В.В. Володин¹, А.В. Качанов¹, И.А. Гоптарь¹, Ю.А. Дуванова¹, А.Н. Лукашев¹, Н.Ф. Закирова², А.В. Иванов², В.П. Чуланов^{1,2}, Д.С. Костюшев^{1,2}

¹ *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Сеченовского Университета, Москва, Россия*

² *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

* *ivan.karandashov@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-активация; вирусные гепатиты В и D; внутриклеточный противовирусный иммунитет

Using CRISPR Activation systems for the development of antiviral drugs

I.V. Karandashov^{1,2*}, A.P. Kostyusheva¹, S.A. Brezgin^{1,2}, A.S. Frolova¹, A.S. Tikhonov¹, V.V. Volodin¹, A.V. Kachanov¹, I.A. Goptar¹, Yu.A. Duvanova¹, A.N. Lukashev¹, N.F. Zakirova², A.V. Ivanov², V.P. Chulanov^{1,2}, D.S. Kostyushev^{1,2}

¹ *Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow, Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

* *ivan.karandashov@gmail.com*

Key words: CRISPR activation; viral hepatitis B and D; antiviral innate immunity

Коинфекция вирусами гепатита В (ВГВ) и D (ВГД) вызывает наиболее тяжелую и быстро прогрессирующую форму вирусного гепатита. Пятилетняя выживаемость инфицированных пациентов не превышает 50% из-за быстрого развития цирроза и рака печени. Одним из перспективных направлений в лечении инфекции является поиск новых противовирусных факторов, способных элиминировать вирус из клеток человека.

В рамках данного исследования был определен список >150 потенциальных противовирусных факторов с исследованием их действия на моделях ВГВ и ВГД при использовании систем транзientной CRISPR-активации транскрипции.

qПЦР подтвердил увеличение транскрипции целевых генов до 20000 раз. По результатам скрининга было выявлено, что 31 фактор способствует снижению более чем на 50% прегеномной РНК (пгРНК) и кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккз ДНК) вируса гепатита В; 96 факторов снижают уровни РНК ВГД на >50%. Наиболее значимое снижение произошло при активации группы генов, связанных с m⁶A-метилированием РНК. Измерение стабильности РНК показало, что при активации отдельных факторов увеличивается скорость деградации РНК ВГВ и ВГД, при этом происходит увеличение стабильности мРНК и уровней белков факторов внутриклеточного ответа TLR3, TBK1, IRF7, STING.

В результате, с использованием систем CRISPR-активации были определены потенциальные кандидаты для элиминации ВГВ и ВГД и определены механизмы действия данных факторов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 25-65-00010.

Оценка экспрессии генов инфламмасомы в индуцированных плюрипотентных клетках

Л.В. Карапетян^{1*}, С.А. Аджемян¹, А.Г. Арамян¹, И.В. Жукова¹, В.О. Айрапетян^{1,2},
Р.В. Захарян^{1,2}, А.А. Аракелян^{1,2}

¹ Российско-Армянский (Славянский) Университет, Ереван, Армения

² Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения

* lana.karapetyan@rau.am

Ключевые слова: Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ); инфламмасома; ИПСК; макрофаги

Evaluation of inflammasome gene expression in induced pluripotent stem cells

L.V. Karapetyan^{1*}, S.A. Atshemyan¹, A.G. Aramyan¹, I.V. Zhukova¹, V.H. Hayrapetyan^{1,2},
R.V. Zakharyan^{1,2}, A.A. Arakelyan^{1,2}

¹ Russian-Armenian University, Yerevan, Armenia

² Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan, Armenia

* lana.karapetyan@rau.am

Key words: Familial Mediterranean Fever (FMF); inflammasome; iPSCs; macrophages

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) – генетически детерминированное аутовоспалительное заболевание, передающееся преимущественно по аутосомно-рецессивному типу наследования и вызванное точечными мутациями гена *MEFV* (Mediterranean FeVer). Целью данного исследования была оценка экспрессии генов инфламмасомы (*p65*, *Casp1*, *MEFV* и *NLRP3*) у пациентов с ССЛ по сравнению с контрольной группой для понимания изменений, которые могут играть ключевую роль в развитии заболевания. Мы обнаружили изменения уровня экспрессии полной изоформы *MEFV*, а также генов *Casp1* и *p65* у пациентов с ССЛ по сравнению с контрольной группой [1]. Также наблюдались изменения уровня экспрессии некоторых генов инфламмасомы (*p65*, *MEFV* и *NLRP3*) по сравнению с контрольной группой у ранее полученных ИПСК [2] и у дифференцированных макрофагов. Полученные данные подчеркивают значение генов инфламмасомы для развития ССЛ.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке КВОН МОНКС РА в рамках научного проекта № 25YR-1F023 (рук. С.А. Аджемян).

Список литературы

1. Hayrapetyan V., Karapetyan L., Ghukasyan L. et al. Association of Inflammasome Gene Expression Levels with Pathogenesis of Familial Mediterranean Fever in Armenians. *Int J Mol Sci.* 2024;25(23):12958
2. Grigor'eva E.V., Karapetyan L.V., Malakhova A.A. et al. Generation of iPSCs from a patient with the M694V mutation in the *MEFV* gene associated with Familial Mediterranean fever and their differentiation into macrophages. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):6102

Разработка системы мониторинга изменений редокс-параметров при острой ишемии миокарда на моделях *in vitro* и *in vivo*

Р.М. Карпов^{1*}, В.С. Овечкина^{1,2}, В.В. Белоусов^{1,2,3}, А.А. Можяев^{1,2,3,4}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

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

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

* kruslan147@mail.ru

Ключевые слова: генетически кодируемые биосенсоры; прижизненный биоимиджинг; инфаркт миокарда; ишемия; окислительный стресс

Development of a monitoring system for redox-status changes in acute myocardial ischemia using *in vitro* and *in vivo* models

R.M. Karpov^{1*}, V.S. Ovechkina^{1,2}, V.V. Belousov^{1,2,3}, A.A. Mozhaev^{1,2,3,4}

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

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

⁴ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

* kruslan147@mail.ru

Key words: genetically encoded biosensors; live bioimaging; myocardial infarction; ischemia; oxidative stress

Острый инфаркт миокарда (ОИМ), представляющий собой некроз участка миокарда из-за острого нарушения кровоснабжения в коронарных артериях, остается ведущей причиной смертности населения от сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из главных звеньев патогенеза ОИМ является развитие окислительного стресса, степень которого определяет тяжесть клинических осложнений. Использование генетически кодируемых биосенсоров, например, SypHer3s, SypHerRed и HyPer7, позволяет проводить мониторинг изменений редокс-параметров в живых биологических системах.

В данной работе были созданы конструкции, которые с помощью кардиоспецифического промотора cTnT обеспечивали экспрессию биосенсоров в кардиомиоцитах. На неонатальной культуре кардиомиоцитов мышей C57BL/6 была продемонстрирована успешная AAV-опосредованная доставка генетических конструкций, кодирующих биосенсоры SypHer3s и HyPer7. Кроме того, подобраны условия для ко-трансдукции SypHerRed и HyPer7 в разных компартментах одной клетки. С помощью биосенсора SypHer3s были получены результаты, свидетельствующие об изменении уровня pH в миокарде функционирующего сердца мышей C57BL/6 при хирургическом моделировании ОИМ. Для проведения прижизненного биоимиджинга сердца было создано устройство для пространственной фиксации сердца *in vivo*. Результаты исследования создают основу для углубленного понимания молекулярных механизмов развития окислительного стресса при ОИМ.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-75-10111 (https://rscf.ru/prjcard_int?23-75-10111).

Исследование эксцизионной репарации оснований с помощью нокаутных клеточных линий человека

Д.В. Ким^{1*}, Д.О. Жарков^{1,2}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

* kim.daria.nsk@gmail.com

Ключевые слова: АП-сайт; APEX1; 293FT; нокаут

Study of base excision repair with human knockout cell lines

D.V. Kim^{1*}, D.O. Zharkov^{1,2}

¹ Institute of chemical biology and fundamental medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk national research state university, Novosibirsk, Russia

* kim.daria.nsk@gmail.com

Key words: AP-site; APEX1; 293FT; knockout

Апурин-апиримидиновые (АП-) сайты – это наиболее распространенные повреждения ДНК, возникающие как из-за спонтанной потери основания, так и в ходе эксцизионной репарации оснований. В клетках человека АП-сайты подвергаются репарации АП-эндонуклеазой 1 (APEX1). Мышечные модели и клеточные линии, нокаутные по АП-эндонуклеазе, хорошо исследованы и охарактеризованы. Однако остается малоизученным процесс репарации АП-сайтов в таких клетках. Мы исследовали эффективность репарации АП-сайтов в клеточной линии 293FT, нокаутной по гену *APEX1*, с помощью плазмидной репортерной системы [1]. Для этого в кодирующую часть нефлуоресцентного варианта *EGFP* в транскрибируемую цепь вводили либо синтетический аналог АП-сайта, либо урацил, который в клетке после удаления основания дает натуральный АП-сайт. Затем клетки трансфицировали полученными плазмидными конструктами и оценивали уровень флуоресценции EGFP. Было показано, что в клеточной линии 293FT *APEX1*^{-/-} синтетический аналог АП-сайта и урацил подвергаются эффективной репарации, что свидетельствует об альтернативных репарационных системах. В клетках человека имеется гомолог APEX1, APEX2, который обладает минорной АП-эндонуклеазной активностью. Нами были получены клеточные линии с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2*. Было показано, что АП-сайты эффективно подвергаются репарации в этих клетках. ДНК-гликозилазы, которые удаляют поврежденное основание в ходе эксцизионной репарации оснований, способны процессировать АП-сайты. Среди таких бифункциональных ДНК-гликозилаз можно выделить NTHL1, которая обладает выраженной АП-лиазной активностью. Нами было показано, что в клеточной линии *NTHL1*^{-/-} снижена эффективность репарации натурального АП-сайта, что свидетельствует о роли NTHL1 как запасной системы в репарации АП-сайтов.

Финансирование: Исследование поддержано российским научным фондом № 21-64-00017П (интернет-ссылка <https://rscf.ru/project/21-64-00017/>).

Список литературы

1. Rodriguez-Alvarez M., Kim D., Khobta A. EGFP reporters for direct and sensitive detection of mutagenic bypass of DNA lesions. *Biomolecules*. 2020;10(6):902

Особенности кальциевого гомеостаза у кардиомиоцитов с мутацией *FLNC* A1186V

Е.С. Клименко^{1*}, Е.Г. Никитина¹, А.А. Костарева^{1,2}

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

* bymalvina@gmail.com

Ключевые слова: филамин C; кардиомиопатия; кальциевый имиджинг; электростимуляция

Features of calcium homeostasis in cardiomyocytes with *FLNC* A1186V mutation

E.S. Klimentko^{1*}, E.G. Nikitina¹, A.A. Kostareva^{1,2}

¹ Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

² Department of Women's and Children's Health and Center for Molecular Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

* bymalvina@gmail.com

Key words: filamin C; cardiomyopathy; calcium imaging; electrical stimulation

Филамин C, кодируемый геном *FLNC*, играет ключевую роль в поддержании структурной целостности саркомера. Его мутации ассоциированы с различными миопатиями и кардиомиопатиями. Нарушение функции *FLNC* приводит к изменениям кальциевой динамики и клеточного дыхания из-за дезорганизации цитоскелета и повреждения взаимосвязей между саркоплазматическим ретикуломом, митохондриями и клеточной мембраной.

Мутации *FLNC* могут провоцировать образование патологических белковых агрегатов, которые нарушают процессы аутофагии и внутриклеточного транспорта. Это, в свою очередь, может влиять на правильную локализацию ионных каналов и изменять экспрессию потенциал-зависимых канальных белков, что потенциально приводит к нарушению дифференцировки кардиомиоцитов, развитию рестриктивной кардиомиопатии и аритмогенных нарушений.

В ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» был обследован пациент с рестриктивной кардиомиопатией и дистальной миопатией на фоне миссенс-мутации A1186V в гене *FLNC* в 10 домене. Полученные от пациента и здоровых доноров клеточные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека дифференцировались в кардиомиоциты (КМ-иПСК) на протяжении 45 дней. Были исследованы кальциевые транзиенты, индуцированные электростимуляцией, с использованием кальций-чувствительного флуоресцентного зонда Fura-2AM на установке IonOptix (IonOptix, USA) и депо-опосредованный вход на фоне химической стимуляции тапсигаргином. Для КМ-иПСК с мутацией *FLNC* A1186V характерно уменьшение амплитуды на 32% и увеличение длительности кальциевого транзиента на 21% по сравнению с КМ-иПСК здоровых доноров. Было обнаружено уменьшение скорости высвобождения и восстановления кальция на 40% по сравнению с КМ-иПСК здоровых доноров. Депо-опосредованный вход кальция был снижен на 34%. Полученные данные свидетельствуют о грубых нарушениях кальциевого гомеостаза у кардиомиоцитов с мутацией *FLNC*, что, вероятно, связано с нарушенной дифференцировкой.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 25-15-00552.

Роль *Psmb8* в поддержании протеостаза в ЭСК мыши

Д.В. Кригер*, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

* dkrigrer@incras.ru

Ключевые слова: иммунопротеасома; *Psmb8*; ЭСК; дифференцировка

The role of *Psmb8* in maintaining proteostasis in mouse ESC

D.V. Kriger*, A.N. Tomilin, A.S. Tsimokha

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

* dkrigrer@incras.ru

Key words: immunoproteasome; *Psmb8*; ESC; differentiation

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают потенциалом к неограниченному воспроизведению и способности дифференцироваться в любые типы клеток организма. Благодаря этим свойствам ЭСК являются ценным инструментом как для фундаментальных исследований раннего эмбриогенеза, так и для разработки клеточных терапий и подходов регенеративной медицины. Для их эффективного применения необходимо понимание механизмов, как поддерживающих плюрипотентность, так и регулирующих дифференцировку. Ключевую роль в сохранении плюрипотентности ЭСК играют системы поддержания протеостаза. Особое место среди них занимает убиквитин-протеасомная система (УПС), отвечающая за деградацию поврежденных, неправильно свернутых и регуляторных белков. Нарушения в работе УПС могут приводить к утрате плюрипотентности или аномальной дифференцировке. Важной особенностью УПС является ее пластичность, обеспечивающая быструю адаптацию к изменениям физиологического состояния клетки в процессе дифференцировки. Иммунопротеасомы – специализированный тип протеасом с альтернативным составом каталитических субъединиц. Их роль традиционно связывали с иммунным ответом, однако растущее число данных указывает на их участие в поддержании протеостаза при стрессе и на ранних этапах дифференцировки. Цель нашей работы – исследование вклада иммунопротеасом в регуляцию протеостаза ЭСК мыши. Мы установили, что выход ЭСК из состояния наивной плюрипотентности сопровождается транзитной активацией экспрессии каталитических субъединиц иммунопротеасом, достигающей пика на 3-й день мезодермальной дифференцировки *in vitro* и снижающейся к 6-му дню, возвращаясь к уровню, характерному для наивного состояния. Для оценки функциональной роли иммунопротеасом были созданы линии ЭСК с нокаутом гена *Psmb8* – ключевой субъединицы, необходимой для сборки комплекса иммунопротеасомы. Эти клетки демонстрировали резкое снижение жизнеспособности в условиях метаболического стресса, что подтверждает значимость иммунопротеасом в поддержании протеостаза в критические периоды выхода клеток из состояния плюрипотентности и запуска программ ранней дифференцировки.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 22-14-00390-П, (https://rscf.ru/project/Ew899Z21cndf0F-JlmGRF81q8Sp79VVFIE3tPEHphUBGPy_GZX038C2AEwLLIWFSmehSgY5qC1o~/).

Антитела к нейраминидазе против вирусов гриппа А после иммунизации сезонными противогриппозными вакцинами

П.А. Кударь^{1*}, М.В. Сергеева², А.Р. Рекстин¹, Е.А. Романовская-Романько², В.З. Кривицкая², К.С. Кудря², Э.А. Крылова¹, М.О. Курпияева¹, М.А. Стукова², Ю.А. Дешева¹

¹ ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

² НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

* polina6226@mail.ru

Ключевые слова: грипп; антитела; ингибирование нейраминидазы

Neuraminidase antibody response to influenza A viruses after immunization with seasonal influenza vaccines

P.A. Kudar^{1*}, M.V. Sergeeva², A.R. Rekstin¹, E.A. Romanovskaya-Romanko², V.Z. Krivitskaya², K.S. Kudria², E. A. Krylova¹, M.O. Kurpiaeva¹, M.A. Stukova², Y.A. Desheva¹

¹ FSBSI "IEM", Saint Petersburg, Russia

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

* polina6226@mail.ru

Key words: influenza; antibodies; neuraminidase inhibition

Вакцинация против гриппа важна при распространении SARS-CoV-2 для защиты здоровья и снижения нагрузки на систему здравоохранения. Гуморальный иммунитет против нейраминидазы (NA) вируса гриппа может облегчить инфекцию ее новыми антигенными вариантами. Совместная оценка антител к NA с антителами к гемагглютинину (HA) может помочь в исследовании эффективности вакцин против гриппа.

Целью исследования было изучение перекрестной реактивности и функциональных свойств ингибирующих NA антител, вызванных сезонной иммунизацией против гриппа.

Были изучены 64 пары сывороток пациентов, иммунизированных в 2018 г. сезонными гриппозными вакцинами, содержащими вакцинные штаммы, рекомендованные ВОЗ для эпидемического сезона 2018-2019 г.: A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09 и A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2). Антитела к дрейфовым вирусам A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(H1N1)pdm09 и A/Brisbane/34/2018(H3N2) исследовались до и через 21 день после вакцинации. Для оценки антител к NA применялась реакция ингибирования нейраминидазной активности с реассортантными вирусами A/H6N1 и A/H6N2. Антитела к HA оценивались в реакции торможения гемагглютинации.

Сезонные вакцины вызвали значительный ответ антител к NA против вирусов A/H1N1pdm09 и A/H3N2, особенно среди пожилых пациентов. Но «коллективный» иммунитет к дрейфовым вирусам A/H1N1pdm09 и A/H3N2 снизился в сравнении с ранее циркулирующими штаммами. У молодых пациентов после вакцинации уровень антител к NA против нового штамма A/H1N1pdm09 был статистически значимо ниже.

Сниженный ответ на NA N1 дрейфового вируса A/H1N1pdm09 выявлен у лиц моложе 60 лет. Выдвинута гипотеза, что при несовпадении HA вакцинация против вирусов гриппа, содержащих N1, необходима лицам до 60 лет, а содержащих N2 – для более широких слоев населения.

Финансирование: Исследование поддержано за счет субсидии Минобрнауки РФ, № темы FGWG-2023-0002.

Оценка применения системы CRISPR-Cas9 в комбинации с флуорогенными зондами для клеточного имиджинга

Л.Г. Малошенок^{1*}, Г.А. Абушинова¹, Абдеева И.А.¹, Васина Е.М.³, В.В. Жердева²

¹ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

* maloshenoklg@gmail.com

Ключевые слова: dCas9; флуорогенные зонды; sgRNA; РНК аптамеры

Evaluation of CRISPR–Cas9-based strategies for cellular imaging using fluorogenic probes

L.G. Maloshenok^{1*}, G.A. Abushinova¹, I.A. Abdeeva¹, E.M. Vassina³, V.V. Zherdeva²

¹ Institute of general genetics RAS, Moscow, Russia

² Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS, Moscow, Russia

³ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

* maloshenoklg@gmail.com

Key words: dCas9; fluorogenic probes; sgRNA; RNA aptamers

Мы создали модифицированные гидовые РНК (гРНК) системы CRISPR–dCas9 с встроенными РНК-аптамерами tdBroccoli и MangoIV в петли 1, 2 или на 3'-конце tracrРНК. На основе ортологов SpdCas9, St1dCas9 и NmdCas9 были сконструированы плазмидные и лентивирусные векторы, направленные на специфическое связывание с теломерными повторами человека. In vitro флуоресцентная спектроскопия показала 300–1000-кратное усиление свечения при взаимодействии аптамеров с красителями DFHBI (tdBroccoli) и TO3 (MangoIV) с высокой аффинностью в наномолярном диапазоне (3–6 нМ для MangoIV–TO3, 2–3 нМ для tdBroccoli–DFHBI). Встраивание аптамерных последовательностей не нарушало формирование комплекса dCas9–гРНК и специфическое связывание с геномными локусами, что подтвердили флуоресцентная микроскопия клеток человека с dCas9–FP. Полученные данные демонстрируют, что модифицированные гРНК с аптамерами эффективно визуализируют геномные локусы без белковых флуоресцентных меток и пригодны для мультиплексного прижизненного имиджинга. *Финансирование:* грант РФ №22-14-00205 и государственное задание ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.

Флуоресцентный метод количественной оценки и оптимизации связывания комплексов dCas-гРНК с ДНК

Н.Ю. Мамаева^{1*}, П.Г. Фескин¹, В.А. Яковлев¹, А.К. Шайтан^{1,2}

¹ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

* *mamaeva19n@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-dCas; редактирование эпигенома; регуляция транскрипции; поляризация флуоресценции

Fluorescence-based method for quantitative assessment and optimization of dCas–gRNA–DNA complex binding

N.Yu. Mamaeva^{1*}, P.G. Feskin¹, V.A. Yakovlev¹, A.K. Shaytan^{1,2}

¹ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

² *Institute of Gene Biology, Moscow, Russia*

* *mamaeva19n@gmail.com*

Key words: CRISPR-dCas; epigenome editing; transcriptional regulation; fluorescence polarization

Система CRISPR/(d)Cas9, помимо редактирования генома, используется для направленной регуляции экспрессии генов и эпигеномного редактирования. Среди известных вариантов наиболее распространенным является белок dSpCas9, обладающий высокой эффективностью, но большим размером, что создает проблемы, связанные с доставкой. Более компактные системы, такие как SaCas9 и CjCas9, легче интегрировать в векторные конструкции, но они уступают по эффективности связывания. Оптимизация этих белков может повысить их сродство к целевым последовательностям ДНК и усилить эпигенетический эффект. Для решения этой задачи необходимы точные количественные оценки силы связывания комплексов dCas–гРНК–ДНК. В данной работе разработаны и оптимизированы флуоресцентные методики измерения на планшетном ридере, позволяющие определять константы связывания в *in vitro* системах и создавать основу для рациональной инженерии Cas-белков с улучшенными характеристиками. Эксперименты проводились с очищенными белками SpdCas9, SadCas9 и CjdCas9. Параметры взаимодействия комплексов dCas–гРНК–ДНК определялись методом измерения поляризации флуоресценции с использованием планшетного сканера.

В ходе работы разработан метод характеристики параметров связывания на основе измерения поляризации флуоресценции. С применением данного подхода определены константы связывания комплексов dCas–гРНК с ДНК при различных значениях ионной силы, а также установлены минимальные условия по ионной силе, необходимые для формирования стабильных комплексов, что имеет особое значение, например, при электропорации. Разработанный метод может быть использован для рациональной оптимизации дизайна Cas-белков и внесения направленных мутаций, а также для оценки эффективности созданных конструкций на ранних этапах их разработки.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539).

Разработка клеточных линий для производства рекомбинантных белков с использованием CRISPR/Cas9-опосредованной активации эндогенных факторов роста

В.А. Манувера*, П.А. Бобровский, Е.Н. Графская, Д.Д. Харлампиева, В.Н. Лазарев
*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*
* vmanuvera@yandex.ru

Ключевые слова: CRISPR-Cas9; пролиферация; факторы роста; HEK293

Development of cell lines for recombinant protein production using CRISPR/Cas9-mediated activation of endogenous growth factors

V.A. Manuvera*, P.A. Bobrovsky, E.N. Graftskaia, D.D. Kharlampieva, V.N. Lazarev
*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological
Agency, Moscow, Russia*
* vmanuvera@yandex.ru

Key words: CRISPR-Cas9; proliferation; growth factors; HEK293

Эффективное производство рекомбинантных белков для медицинских применений требует клеточных культур, способных к суспензионному росту в средах минимального состава, свободных от компонентов животного происхождения, таких как эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС). Это обеспечивает масштабируемость, экономическую эффективность и снижает риск контаминации. В данной работе предложен новый подход к созданию клеточных линий, способных к автономной пролиферации за счет активации эндогенных генов факторов роста. В качестве модели использована линия Expi293F – суспензионный вариант клеток эмбриональной почки человека HEK293, оптимизированный для высокоплотного культивирования и продукции рекомбинантных белков. Для снижения зависимости от экзогенных факторов роста применена система CRISPR-Cas9-SAM (синергичные медиаторы активации), позволяющая избирательно усилить экспрессию генов *IGF-1*, *FGF-2* и *EIF3I*, критически важных для пролиферации. В ходе работы было показано, что модифицированные линии (Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I) демонстрируют повышенную скорость роста в стандартной среде с ЭТС. В среде без ЭТС автономный рост возможен только при совместном культивировании всех трех модифицированных линий. Кроме того, показано, что кондиционированная среда от модифицированных клеток повышает метаболическую активность нативных Expi293F. Полученные данные подтверждают, что активация эндогенных факторов роста позволяет снизить зависимость клеточных культур от экзогенных добавок. Дальнейшая оптимизация системы может привести к созданию полностью автономных линий, что упростит и удешевит производство рекомбинантных белков для биомедицины.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы № 075-15-2025-518).

Нокаут гена *UBE2A* изменяет подвижность и пролиферацию клеток при нейрогенезе

Р.В. Миронов^{1*}, А.О. Кустова², Д.В. Голиусова¹, М.Е. Богомякова¹, Е.А. Воловиков¹,
Е.В. Емец¹, А.Д. Ульянов¹, Е.В. Кондакова², В.С. Тарабыкин²,
А.Н. Богомазова¹, М.А. Лагарькова¹

¹ ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² НИИ «Нейронаук» ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

* rwmironow@gmail.com

Ключевые слова: *UBE2A*; клеточная подвижность; клеточный цикл; развитие мозга

UBE2A knock-out changes cell motility and proliferation in neurogenesis

R.V. Mironov^{1*}, A.O. Kustova², D.V. Goliusova¹, M.E. Bogomiakova¹, E.A. Volovikov¹,
E.V. Yemets¹, A.D. Ulyanov¹, E.V. Kondakova², V.S. Tarabykin²,
A.N. Bogomazova¹, M.A. Lagarkova¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Institute of Neuroscience, Laboratory of Genetics of Brain Development, National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

* rwmironow@gmail.com

Key words: *UBE2A*; cellular motility; cell cycle; brain development

Синдром умственной отсталости по типу Насименто – нарушение развития ЦНС, связанное с дисфункцией гена *UBE2A*. Помимо нарушений развития ЦНС у пациентов иногда наблюдают пороки сердца. Этот ген кодирует одноименный убиквитин-конъюгирующий фермент, роль которого в нейрогенезе и кардиогенезе остается слабо изученной.

Нами ранее из ИПСК здорового донора были получены изогенные ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*. Анализ транскриптома показал, что в нокаутных нейральных предшественниках (НП) изменена экспрессия ряда генов, вовлеченных в клеточную подвижность и в регуляцию клеточного цикла. Также ранее было показано, что нокаутные ИПСК отличаются увеличенным размером ядра. В данной работе ИПСК дифференцировали в НП, кардиомиоциты и фибробласты для изучения размеров ядра. Также был проведен эксперимент с *in utero* электропорацией эмбрионов мышей на сроке E13.5 с целью изучения функциональных последствий нокаута гена *Ube2a*.

При нокауте *UBE2A* у НП обнаружен увеличенный размер ядра, чего не было выявлено у фибробластов и кардиомиоцитов. При нокауте гена *Ube2a* у эмбрионов мышей обнаружена ускоренная миграция нейральных производных на сроках E15.5 и E16.5, а также повышенная представленность нейральных клеток, содержащих маркеры пролиферации и репликации.

Таким образом, мы показали, что в процессе нейрогенеза ген *UBE2A* вовлечен в регуляцию миграции и пролиферации. Сравнительные исследования размеров ядра дифференцированных производных ИПСК указывают на тканеспецифичные функции этого гена при нейрогенезе.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием «Органоид сердца 25-27», № 125030703325-7.

Исследование возможности модуляции SLIT-ROBO сигнального пути для коррекции фиброзно-воспалительных изменений при наследственных заболеваниях миокарда

Е.Г. Никитина*, А.А. Костарева, А.М. Злотина

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* purrpurr@list.ru

Ключевые слова: SLIT-ROBO сигнальный путь; стромальные клетки сердца; наследственные заболевания миокарда; фиброз; короткие РНК-шпильки

Possibility of the SLIT-ROBO signaling pathway modulation for the correction of fibro-inflammatory changes in hereditary myocardial diseases

E.G. Nikitina*, A.A. Kostareva, A.M. Zlotina

Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

* purrpurr@list.ru

Key words: SLIT-ROBO signaling pathway; cardiac stromal cells; inherited myocardial diseases; fibrosis; shRNA

SLIT-ROBO сигнальный путь представляет эволюционно консервативный внутриклеточный каскад, опосредующий различные процессы, в том числе направление роста аксонов, ангиогенез, клеточную адгезию, миграцию и пролиферацию, динамику цитоскелета. У млекопитающих выявлено три секретируемых лиганда (Slit1-3) и четыре мембранных рецептора (Robo1-4). К настоящему моменту хорошо показана ассоциация патогенных вариантов в генах *SLIT* и *ROBO* с различными аномалиями развития, включая врожденные пороки сердца. Также отмечено, что сигнальный каскад SLIT-ROBO стимулирует активность фибробластов и продукцию фибриллярного коллагена и способствует развитию фиброза в постнатальном сердце. Однако точные молекулярно-клеточные механизмы патогенеза заболевания остаются не расшифрованными.

В настоящей работе с помощью лентивирусных конструкторов, несущих последовательности коротких РНК-шпилек (shRNA), нами получены культуры стромальных клеток сердца человека со сниженной экспрессией генов *ROBO1*, *SLIT2* и *SLIT3*. Проведено исследование эффекта подавления SLIT-ROBO сигнального каскада в отношении экспрессионного профиля первичных культур стромальных клеток сердца, в том числе в отношении генов, отвечающих за процессы фиброза и воспаления. В частности, методом ПЦР в реальном времени определены дифференциально экспрессирующиеся маркеры среди генов *COL1A1*, *COL3A1*, *ACTA2*, *NPPA*, *NPPB*, *MYH7*, *POSTN*, *FBN1*, *YAP1*, *RHOA*, *ROCK1* и *TGF-β1* при нокдауне генов SLIT-ROBO сигналинга по сравнению с контрольными клетками (shRNA-scramble).

Результаты настоящего исследования, а также полученные ранее данные, позволяют отнести SLIT-ROBO сигнальный путь к перспективным потенциальным терапевтическим мишеням для антифибротической и противовоспалительной терапии врожденных заболеваний сердца.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ, № 24-15-20026 (<https://rscf.ru/project/24-15-20026/>).

Модель органоидов на основе мезенхимальных клеток PDGFR α + легких мыши и бронхоальвеолярных стволовых клеток

Ю.А. Новикова*, И.А. Говорова, С.Ю. Никиточкина, А.А. Воложинская, Е.А. Воротеляк

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

*yula1308@mail.ru

Ключевые слова: PDGFR α клетки; органоиды легких мыши; клеточная дифференцировка

An organoids model based on mouse lung PDGFR α + mesenchymal cells and bronchioalveolar stem cells

Y.A. Novikova*, I.A. Govorova, S.Y. Nikitochkina, A.A. Volozhinskaya, E.A. Vorotelyak

Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia

*yula1308@mail.ru

Key words: PDGFR α cells; mouse lung organoids; cellular differentiation

PDGFR α + клетки легкого включают в себя клетки альвеолярной ниши, мио-, липо- и матриксные фибробласты и играют важную роль в процессах формирования и поддержания альвеол и регенерации. При этом, не до конца изучено, как именно PDGFR α + клетки влияют на направление дифференцировки стволового эпителия во время морфогенеза.

Целью данной работы являлась разработка и верификация модели органоидов, отображающей взаимодействие стволового эпителия и PDGFR α + клеток мезенхимы в морфогенезе легкого мыши.

Клетки были выделены из легких половозрелых мышей линии C57Bl/6. Мезенхима PDGFR α +, полученная с помощью MACS, и бронхоальвеолярный стволовой эпителий EpCAM+Sca1+, полученный после FACS, сочетали в соотношении 9:1 и культивировали в матрикеле (Corning) во вставках (Transwell) в течение 14 сут. В качестве контроля использовали сочетание отрицательной фракции мезенхимы PDGFR α - и EpCAM+Sca1+.

Полученные группы органоидов соответствовали характеристикам бронхиолярных, альвеолярных и бронхоальвеолярных органоидов по морфологии, результатам ПЦР анализа и иммунофлуоресцентного окрашивания (SFTPC, AGER, CC10, KRT14).

В PDGFR α + органоидах наблюдалось положительное окрашивание на α -SMA, но не на PDGFR α , что, вероятно, указывает на возможную дифференцировку PDGFR α клеток в миофибробласты, в то время как в PDGFR α - органоидах положительное окрашивание на PDGFR α наблюдалось только в альвеолярных органоидах, а окрашивание на α -SMA практически отсутствовало. Доля пролиферирующих клеток в PDGFR α + и PDGFR α - составила 31 и 16% соответственно.

Таким образом, разработана модель органоидов на основе PDGFR α + клеток, которые, вероятно, обеспечивают потенциальную дифференцировку изначально «нейтральных» прогениторов как в альвеолярный, так и бронхиолярный эпителий легких.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-74-30015-П.

Влияние агонистов рецепторов PPAR δ на метаболизм кардиомиоцитов, полученных из ИПСК

С.В. Павлова^{1,2*}, Д.А. Сорогина¹, А.Е. Шульгина¹, С.М. Закиан^{1,2}, Е.В. Дементьева^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

* spav@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: кардиальная дифференцировка; созревание кардиомиоцитов; PPAR δ рецепторы

Effect of PPAR δ receptor agonists on the metabolism of iPSC-derived cardiomyocytes

S.V. Pavlova^{1,2*}, D.A. Sorogina¹, A.E. Shulgina¹, S.M. Zakian^{1,2}, E.V. Dementyeva^{1,2}

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

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

* spav@bionet.nsc.ru

Key words: cardiac differentiation; cardiomyocyte maturation; PPAR δ receptors

Кардиомиоциты, дифференцированные из ИПСК, являются незрелыми и имеют низкий уровень окислительного фосфорилирования. Для созревания кардиомиоциты культивируют в специальных средах, в том числе в присутствии агонистов рецепторов PPAR δ [1]. Активированные рецепторы PPAR δ являются транскрипционными факторами, которые влияют на различные генные пути, в том числе регулируют уровень энергетического метаболизма в кардиомиоцитах. Дифференцированные из ИПСК кардиомиоциты культивировали в среде для созревания в присутствии агонистов рецептора PPAR δ GW0742 (Sigma) и ретиноевой кислоты (RA, Sigma) и анализировали клеточное дыхание с помощью технологии Seahorse (Agilent). Уровни потребления кислорода в базальных условиях, максимальное потребление кислорода и резервная дыхательная способность были выше у кардиомиоцитов, которые культивировались в присутствии RA (2.5 мкМ), по сравнению с кардиомиоцитами в контрольной среде для созревания. Однако в присутствии GW0742 (5 мкМ) показатели клеточного метаболизма были ниже по сравнению с контрольными кардиомиоцитами. Данные нормировались на количество клеток в поле зрения. Было обнаружено, что в присутствии RA в среде для созревания кардиомиоциты продолжают делиться, тогда как в контрольной среде происходила остановка пролиферации. Можно сделать предварительный вывод, что созревание кардиомиоцитов в присутствии ретиноевой кислоты, агониста PPAR δ , приводит к стимулированию пролиферации кардиомиоцитов на сроке 35–40 дней дифференцировки и поддержанию в них дыхания с помощью окислительного фосфорилирования.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015.

Список литературы

1. Wickramasinghe N.M., Sachs D., Shewale B. et al. PPAR δ activation induces metabolic and contractile maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. 2022;29:559-576.e7. doi 10.1016/j.stem.2022.02.011

Взаимодействие белков-Аргонавтов с тιοфосфатными системами рестрикции-модификации в процессе вирусной инфекции

В.А. Пантелеев*, Б.К. Годнеева*, Д.М. Гельфенбейн, А.В. Кульбачинский**

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

** авторы внесли равный вклад*

*** avkulb@yandex.ru*

Ключевые слова: бактериальный иммунитет; белки-Аргонавты; системы рестрикции-модификации; бактериофаги

Interaction of Argonaute proteins with phosphorothioation restriction-modification systems during phage infection

V.A. Panteleev*, B.K. Godneeva*, D.M. Gelfenbein, A.V. Kulbachinskiy**

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

** equal contribution*

*** avkulb@yandex.ru*

Key words: bacterial immunity; Argonaut proteins; restriction-modification systems; bacteriophages

Бактериальный антифаговый иммунитет обладает сложной организацией и включает разнообразные антифаговые системы. Белки-Аргонавты и тιοфосфатные системы рестрикции модификации (ТСРМ) широко распространены у бактерий и могут взаимодействовать. Аргонавты распознают и расщепляют ДНК-мишень с помощью гидовых олигонуклеотидов, которые продуцируются из чужеродной ДНК. ТСРМ-системы состоят из модуля модификации, который вносит тιοфосфатные группы в ДНК, и модуля рестрикции, который узнает и атакует немодифицированную ДНК. Нами были исследованы взаимодействия Аргонавтов и систем ТСРМ, а также особенности процессинга вирусной ДНК этими системами.

Исследование проводили в клетках *E. coli*, экспрессирующих белок-Аргонавт *Clostridium butyricum* (CbAgo) и ТСРМ-систему Dnd. Для выявления возможного синергизма между системами оценивали устойчивость бактерий к фагам T5, P1 и λ при совместной и отдельной экспрессии CbAgo и Dnd. Был проведен мониторинг кинетики бактериального роста и оценка бляшкообразующей активности. Было выявлено усиление антифаговой защиты против фагов P1 и λ при коэкспрессии обеих систем. Для детекции процессинга фаговой и клеточной ДНК мы выделили и отсековировали Аргонавт-ассоциированные короткие ДНК из инфицированных клеток. Анализ библиотек, полученных с использованием только каталитически неактивного Аргонавта, выявил активный естественный процессинг фаговой ДНК, что соответствует успешной репликации фага. В присутствии активного Аргонавта и ТСРМ-системы наблюдалось снижение покрытия фаговой ДНК и отсутствие пиков на профилях покрытия, что свидетельствует о подавлении вируса. Экспрессия ТСРМ-системы не изменяет профили покрытия хромосомной ДНК. Тιοфосфатные модификации не влияют на процессинг хромосомной ДНК клеточными нуклеазами.

Таким образом, Аргонавты способны изменять защитную активность ТСРМ систем и могут быть использованы для анализа процессинга ДНК этими и другими защитными системами бактерий.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда 24-44-00107.

Редактирование генов карбоангидраз α -семейства *Arabidopsis thaliana* при помощи эндонуклеазы Cas9

Н.В. Пермякова¹, Н.Н. Руденко^{2*}, Л.К. Игнатова², Е.М. Надеева², Д.В. Ветошкина²,
М.А. Козулёва², Б.Н. Иванов²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

* nataliacherry413@gmail.com

Ключевые слова: карбоангидразы; *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9

Editing of carbonic anhydrase genes of α -family from *Arabidopsis thaliana* using endonuclease Cas9

N.V. Permyakova¹, N.N. Rudenko^{2*}, L.K. Ignatova², E.M. Nadeeva², D.V. Vetoshkina²,
M.A. Kozuleva², B.N. Ivanov²

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

² Institute of Basic Biological Problems, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Russia

* nataliacherry413@gmail.com

Key words: carbonic anhydrase; *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9

За последние несколько лет были получены экспериментальные доказательства изменений в участках ДНК, расположенных на некотором расстоянии от места интеграции Т-ДНК. Для Т-ДНК индуцированных мутантов последствия целевой мутации могут быть замаскированы изменениями в других участках ДНК, что привело к использованию более точных технологий для создания мутаций – инструментов редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9. Наши исследования показали, что карбоангидразы (КА) – ферменты, катализирующие взаимопревращение форм неорганического углерода, играют важную роль в фотосинтезе. Для получения CRISPR/Cas9 мутантов *Arabidopsis thaliana* по генам КА α -семейства использовали инструменты редактирования для внесения точечных мутаций, обладающие различной эффективностью мутагенеза для каждого из генов. При редактировании *aKA4* (*At4g20990*) в поколении T0 была получена точечная мутация, приводящая к сбою рамки считывания, и уже в следующем поколении от самоопыления были выявлены гомозиготы по мутации в этом гене. Нокаут гена *aKA4* повлиял на уровень экспрессии ряда генов, кодирующих белки фотосинтеза, генов, индуцируемых иммунными сигналами растений, а также сказывался на изменении фотосинтетических характеристик.

Для редактирования *aKA2* (*At2g28210*) использовали две направляющих РНК, и уже в поколении T0 было выявлено растение, несущее в одной копии гена большую делецию, а во второй копии гена – небольшую делецию, совмещенную с инверсией, и являющееся гомозиготой по мутации. Для редактирования *aKA5* (*At1g08065*) было отобрано две пары направляющих РНК, однако среди 150 проанализированных растений не было выявлено ни одного мутанта. Возможная причина низкой эффективности редактирования кроется в высоком проценте АТ пар (66%) в кодирующей последовательности этого гена, что представляет собой трудность при редактировании с помощью эндонуклеазы Cas9, которая ориентирована на РАМ NGG.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ 23-14-00396.

Различия в гликопротеинах и возможность раннего защитного действия с использованием ЖГВ на основе дрейфовых вариантов вируса гриппа A/H1N1pdm09

Д.С. Петрачкова*, И.В. Майорова, А.Р. Рекстин, Д.С. Соколовский, П.А. Кударь,
Д.С. Гузенков, Н.В. Копылова, А.С. Трулев, Ю.А. Дешева
ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия
*ya.dashook@ya.ru

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; антигенный дрейф; грипп

Differences in glycoproteins and potential for early protective efficacy of LAIV based on antigenically drifted A/H1N1pdm09 influenza virus variants

D.S. Petrachkova*, I.V. Mayorova, A.R. Rekstin, D.S. Sokolovsky, P.A. Kudar, D.S. Guzenkov,
N.V. Kopylova, A.S. Trulev, Yu.A. Desheva
FSBSI «IEM», Saint Petersburg, Russia
*ya.dashook@ya.ru

Key words: live influenza vaccine; antigenic drift; influenza

Распространение SARS-CoV-2 снижает циркуляцию вирусов гриппа, что может способствовать появлению новых антигенных вариантов. Эволюция вируса связана с антигенным дрейфом, изменяющим структуру гликопротеинов HA и NA. Штамм A/H1N1pdm09 с 2009 г. претерпел значительные изменения, требуя обновления вакцинных штаммов. Живые аттенуированные вакцины (ЖГВ) – перспективное средство профилактики, стимулирующее комплексный иммунный ответ. В отличие от инактивированных, ЖГВ способны прерывать передачу вируса, что было показано в масштабных исследованиях.

В работе изучены вакцинные штаммы на основе двух вариантов дрейфового вируса A(H1N1)pdm09: A/South Africa/3626/13 (A/17/SA/2013) и A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (A/17/GDM/2019). Методами структурной биологии изучены паттерны гликозилирования HA вакцинных штаммов. *In vitro* оценена продукция IFN-I и MX1 белка. Раннюю защиту изучали на мышах через 6 дней после интраназальной иммунизации.

Вакцинные вирусы A/17/SA/2013 и A/17/GDM/2019 показали разные паттерны гликозилирования HA. При равной множественности инфекции в клеточной культуре A549 вирус A/17/SA/2013 вызывал повышенную продукцию IFN-I и белка MX1 по сравнению с A/17/GDM/2019, хотя различия не были статистически значимыми. В дыхательных путях мышей репродуктивная активность штамма A/17/GDM/2019 была не ниже, а иногда выше, чем у A/17/SA/2013. Иммунизация штаммом A/17/SA/2013 стимулировала значимый прирост IgM и IgG уже на 1-й неделе и обеспечивала 70% защиту мышей от летальности при заражении гомологичным вирусом гриппа, адаптированным к мышам.

Различия в гликозилировании HA влияют на цитокиновый и антительный ответ, а также на эффективность вакцин. Штаммы, вызывающие более выраженный интерфероновый и ранний ответ антител, обеспечивают лучшую защиту от гомологичного вируса гриппа. Эти особенности важны при выборе вакцинных штаммов для повышения эффективности иммунопрофилактики.
Финансирование: Исследование поддержано за счет субсидии Минобрнауки РФ, тема № FGWG-2023-0002.

Создание вектора для синтеза гидовых РНК с суперскрученной плазмиды и его валидация с помощью редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*

Д.Н. Поздеев^{1,3}, Э.А. Хуснутдинов¹, М.П. Терехов^{1,2}, Е.В. Михайлова^{1,2,3*}

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

² Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

³ Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

* mikhele@list.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas; гидовые РНК; T7 терминатор; ICE

Construction of a vector for gRNA synthesis from a supercoiled plasmid and its validation by *in vitro* CRISPR/Cas9 editing

D.N. Pozdeev^{1,3}, E.A. Khusnutdinov¹, M.P. Terekhov^{1,2}, E.V. Mikhaylova^{1,2,3*}

¹ Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

² Ufa state petroleum university, Ufa, Russia

³ Ufa university of science and technology, Ufa, Russia

* mikhele@list.ru

Key words: CRISPR/Cas; guide RNA; T7 terminator; ICE

Самым популярным и широко используемым методом CRISPR/Cas редактирования генома свиней является микроинъекция либо электропорация рибонуклеопротеидного комплекса, состоящего из белка Cas и гидовой РНК. Синтез последней – многоступенчатый процесс, от которого во многом зависит успешность редактирования. Обычно синтез осуществляется с плазмиды при помощи фермента T7 РНК-полимеразы. При этом критически важно обеспечивать высокую эффективность остановки транскрипции, что может быть достигнуто путем рестрикции вектора, а также использования более эффективных терминаторов.

Для эффективного редактирования геномов свиней была создана высококопийная плаزمида с усовершенствованным T7-терминатором, куда методом GoldenGate с отрицательной селекцией на стрептомицине может быть клонирована необходимая последовательность спейсера гидовой РНК. Работоспособность конструкции была проверена методом *in vitro* CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования (ICE) на примере двух гидовых РНК к гену *CD163*.

Наработка гидовой РНК проводилась с использованием набора T7 High Efficiency Transcription Kit (Transgen Biotech). Последовательность для редактирования длиной 1096 пн была наработана методом ПЦР с образцов ДНК свиней пород ландрас и йоркшир. Редактирование проводилось в буфере 3.1 (NEB) с использованием белка Cas9 (Biolabmix). После обработки РНКазой и протеиназой продукты реакции визуализировались в агарозном геле. Анализ показал успешное разрезание редактируемого фрагмента RNP-комплексом с образованием фрагментов ожидаемого размера.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2025-014 (№ 075-15-2024-666).

Функциональное значение YAP/TAZ в процессе имплантации мышцы с применением 3D-модели эндометрия

С.М. Румянцева*, А.О. Гайдамака, Е.А. Воротеляк

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* exalfini@gmail.com

Ключевые слова: YAP/TAZ; эндометрий; имплантация эмбриона

Functional role of YAP/TAZ during embryo implantation in mice using a 3D endometrial model

S.M. Rumiantseva*, A.O. Gaidamaka, E.A. Vorotelyak

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, RAS, Moscow, Russia

* exalfini@gmail.com

Key words: YAP/TAZ; endometrium; embryo implantation

YAP/TAZ, являясь транскрипционными коактиваторами, контролируют пролиферацию, дифференцировку, миграцию и выживаемость клеток. Активность YAP/TAZ регулируется сетью сигнальных путей, в том числе механическими стимулами [1]. Поскольку в эндометрии эти процессы особенно динамичны во время децидуализации и имплантации, а знания о роли YAP/TAZ сигналинга в этой ткани фрагментарны, исследования в этом направлении представляют особый интерес.

Наша работа посвящена выяснению механизмов регуляции YAP/TAZ в формировании имплантационной ниши в эндометрии мышцы на модели сфероидов из стромальных клеток эндометрия и стромально-эпителиальных органоидов, сокультивирующихся с эмбрионом.

Ранее мы обнаружили, что активность YAP/TAZ изменяется во время имплантации *in vivo* и зависит от контакта эмбриона с эндометрием: на стадии E5.5 YAP локализуется на границах клеток в очаге имплантации, тогда как вне зоны контакта и на более поздних стадиях преобладает его ядерная локализация. Результаты проточной цитометрии показали, что в процессе децидуализации большая часть CD90⁺ стромальных клеток – сублюминальной популяции, увеличивающейся в период имплантации, – экспрессирует YAP, что указывает на его возможную роль в сохранении фенотипа популяции.

Ингибирование активности YAP/TAZ вертепорфином на E8.5 вызывает утрату ядерной локализации YAP и не влияет на TAZ в децидуальных клетках эндометрия. Такие клетки не проходят функциональную дифференцировку и слабо экспрессируют CD90. В неимплантационной модели эпителиально-стромального органоида подавление YAP приводит к утрате нишевого расположения CD90⁺ клеток, потере апико-базальной полярности и трансформации кубического эпителия в плоский. Эти результаты подтверждают, что поляризованный эпителий необходим для поддержания CD90⁺ фенотипа, и предполагают, что взаимодействие эпителия и стромы опосредуется YAP/TAZ-зависимыми сигналами.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ ИБР РАН, № 21-74-30015-П: <https://www.rscf.ru/project/21-74-30015/>

Список литературы

1. Piccolo S., Dupont S., Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-1312. doi 10.1152/physrev.00005.2014

Масс-фотометрия для исследования комплексов системы CRISPR/Cas9

Л.В. Саковина^{1,2*}, А.В. Ендуткин¹, Д.С. Новопашина^{1,2}, Д.О. Жарков^{1,2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* kodi99@list.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; 2'-модифицированные РНК; масс-фотометрия

Mass Photometry for CRISPR/Cas9 system complex research

L.V. Sakovina^{1,2*}, A.V. Endutkin¹, D.S. Novopashina^{1,2}, D.O. Zharkov^{1,2}

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

² Novosibirsk State University, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* kodi99@list.ru

Key words: CRISPR/Cas9; 2'-modified RNA; Mass Photometry

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 широко применяется в молекулярной биологии и генетической инженерии. Дизайн и использование химически модифицированных направляющих РНК остается актуальным направлением в области исследования систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas9. В данной работе проведено исследование влияния модификаций в составе направляющих РНК на активность CRISPR/Cas9 системы *in vitro*. При сравнительном исследовании эффективности расщепления модельной плазмиды нуклеазой SpyCas9 из *Streptococcus pyogenes* в комплексе с направляющими sgРНК, содержащими 2'-фтор-, 2'-О-метил- и дезоксирибонуклеотиды, а также в присутствии немодифицированной sgРНК, продемонстрировано снижение степени расщепления ДНК-мишени, однако отмечено, что в присутствии 2'-фтормодифицированной sgРНК наблюдалось расщепление более 50% субстрата. С помощью метода интерферометрической рассеивающей микроскопии (ИРМ) возможна регистрация молекулярных масс отдельных молекул. В данной работе проведена оценка метода ИРМ для исследования биохимических свойств эндонуклеазы SpyCas9 и ее комплекса с направляющей sgRNA. Таким образом, была определена соответствующая ранее охарактеризованной молекулярная масса SpyCas9 (155,9 кДа), для SpyCas9 [1]. При определении молекулярной массы sgRNA регистрировали как образование мономерной формы (38 кДа), так и димеров (67,05 кДа). В присутствии sgRNA и SpyCas9 молекулярная масса смещалась и соответствовала 184,9 кДа, что указывает на формирование комплекса. При исследовании стабильности и стехиометрии образования комплекса эндонуклеазы SpyCas9 с направляющими sgРНК с течением времени суммарная масса компонентов комплекса сохранялась в течение нескольких часов. Также наблюдали кратное увеличение массы комплекса, что может указывать на образование димеров.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ № 21-64-00017-П.

Список литературы

1. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014;156:935-949

Вклад генетических вариантов с высокой значимостью в энергетический метаболизм у пациентов с болезнью Паркинсона

А.А. Сафонова^{1,2}, А.А. Малахова^{1*}, Ю.В. Вяткин², С.М. Закиан¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

* amal@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; экзом; генетический вариант

High-impact genetic variants in patients with Parkinson's disease contribute to energy metabolism

A.A. Safonova^{1,2}, A.A. Malakhova^{1*}, Yu.V. Vyatkin², S.M. Zakian¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* amal@bionet.nsc.ru

Key words: Parkinson's disease; exome; genetic variant

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой мультифакторное нейродегенеративное заболевание, в патогенезе которого участвуют как генетические, так и экзогенные факторы. Патогенез болезни связан с потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга. В гибели нейронов задействованы многие механизмы, среди которых нейровоспаление, дисфункция митохондрий, окислительный стресс. Выявлено несколько генов, мутации в которых могут быть связаны с развитием заболевания: *SNCA*, гены семейства *PARK* (например, *LRRK2*, *PARK2*, *PINK1*), *GBA1*. Существуют также полигенные модели развития заболевания, которые предполагают, что БП может быть следствием комплексного взаимодействия множества генетических факторов, т. е. совокупность нескольких изменений в генетическом материале может увеличивать вероятность развития данного заболевания.

В нашей работе проведен анализ данных экзомного секвенирования 32 пациентов с ранним началом БП и/или имеющих случаи заболевания в семейном анамнезе. Были отобраны генетические варианты, оказывающие значимое влияние на структуру белковой молекулы, кодируемой данным геном, по алгоритму ПО Genomenal. Проведено картирование отобранных генетических вариантов на сигнальные пути, представленные в базе данных KEGG. В большинстве исследованных экзотов пациентов выявлены значимые изменения последовательностей генов, задействованных в энергетическом метаболизме клеток. Около 20 % пациентов с ранним началом также имеют изменения в гене *CASP9*. Задачей дальнейших исследований является экспериментальное подтверждение вклада выявленных генетических вариантов в энергетический метаболизм нейронов с помощью клеточных моделей на основе ИПСК с применением методов геномного редактирования.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-15-00224 (<https://rscf.ru/en/project/23-15-00224/>).

Олигонуклеотидные шапероны гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1

Ю.И. Светлова*, Е.И. Малахова, Ю.И. Павлова, В.В. Северов, Т.С. Ведехина, А.М. Варижук
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

*j.i.svetlova@gmail.com

Ключевые слова: биоконденсаты; система аптамер-флуороген; квадруплексы; SARS-CoV-2

Oligonucleotide chaperones of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

J.I. Svetlova*, E.I. Malakhova, Y.I. Pavlova, V.V. Severov, T.S. Vedekhina, A.M. Varizhuk
SRI PCM named after Y.M. Lopukhin FMBA of Russia, Moscow, Russia

*j.i.svetlova@gmail.com

Key words: biocondensates; aptamer-fluorogen system; quadruplexes; SARS-CoV-2

Доступное лечение ряда нейродегенеративных заболеваний из группы протеинопатий не затрагивает первичные патологические процессы, включая неправильную упаковку белков и накопление токсичных белковых агрегатов. Решением могут стать стабилизаторы непатогенных белковых конформаций – синтетические молекулярные шапероны. Перспективной мишенью шаперонотерапии являются гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNP). В работе представлен первый пример рационального дизайна шаперонов hnRNP A1, агрегаты которого служат маркерами бокового амиотрофического склероза и лобно-височной деменции.

Дизайн шаперонов основывался на данных по специфичности РНК-узнающего мотива (RRM) и значимого для агрегации RGG-мотива hnRNP A1 к эндогенным РНК и ДНК. Ингибирующий белковую агрегацию RGG-связывающий олигонуклеотид был дополнен RRM-связывающим фрагментом; в сахарофосфатный остов были введены модификации для оптимизации его геометрии и защиты от биодegradации. Сродство полученных аналогов олигонуклеотидов к hnRNP A1 оценивали методом микромасштабного термофореза, а шаперонную активность – методами флуориметрии и микроскопии.

Установлено, что минимальный ДНК-шаперон RGG-содержащих белков – гуаниновый квадруплекс (G4) – взаимодействует с hnRNP A1 лишь в высоких концентрациях. Однако присоединение RRM-связывающего фрагмента повысило эффективность связывания. При этом ингибиторное действие G4 на агрегацию hnRNP A1 сохранилось. Модификации RRM-связывающего фрагмента, фиксирующие геометрию сахарофосфатного остова в характерной для РНК конформации, положительно сказались его на аффинности к мишени и шаперонной активности.

Таким образом, на примере hnRNP A1 показана перспективность рационального дизайна олигонуклеотидных шаперонов к агрегирующим рибонуклеопротеинам, в которых ответственные за агрегацию неупорядоченные участки прилегают к структурированным RRM. Рациональный дизайн включает комбинирование RRM-связывающей части с фрагментом, ингибирующим агрегацию, и последующую оптимизацию путем модификации сахарофосфатного остова шаперона.

Финансирование: Исследование поддержано ГЗ № 17.002.24.800 «Шаперон».

Использование системы аптамер-флуороген для визуализации биоконденсатов SARS-CoV-2

Ю.И. Светлова^{1*}, Д.А. Широков¹, Т.С. Ведехина¹, А.А. Аралов², А.М. Варижук¹

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² ИБХ РАН, Москва, Россия

* j.i.svetlova@gmail.com

Ключевые слова: биоконденсаты; система аптамер-флуороген; квадруплексы; SARS-CoV-2

Using the aptamer-fluorogen system for visualization of SARS-CoV-2 biocondensates

J.I. Svetlova^{1*}, D.A. Shirokov¹, T.S. Vedekhina¹, A.A. Aralov², A.M. Varizhuk¹

¹ SRI PCM named after Y.M. Lopukhin FMBA of Russia, Moscow, Russia

² IBCh RAS, Moscow, Russia

* j.i.svetlova@gmail.com

Key words: biocondensates; aptamer-fluorogen system; quadruplexes; SARS-CoV-2

Актуальной задачей является разработка новых противовирусных препаратов, в том числе для терапии SARS-CoV-2. Перспективная мишень – РНК-белковые биоконденсаты, значимые для репликации и сборки вирионов в клетке [1]. Тестирование нацеленных на них препаратов требует визуализировать вирусную РНК. Для этого мы предлагаем использовать генетически кодируемую систему аптамер-флуороген [2]. Она уже была опробована на бактериальных РНК [3]. Однако ее применимости для биоконденсатов SARS-CoV-2 могла помешать кросс-реактивность между РНК-шпилькой вирусного генома и аптамером. Наша задача – проверка селективности флуорогенов к аптамеру при наличии прикрепленной к нему вирусной РНК и влияния аптамера на функциональность вирусной шпильки, т. е. ее способность включаться в конденсаты. Селективность флуорогенов оценивали методом флуориметрии. Влияние аптамера и РНК-шпильки на фолдинг друг друга оценивали по данным спектроскопии кругового дихроизма. Показана небольшая степень кросс-реактивности, которая не приводит к критическому снижению “light-up” эффекта. Систему тестировали в модельной клеточной линии HEK293T. Проводили сотрансфекцию плазмидами, кодирующими РНК-шпильку слитую с аптамером и нуклеокапсидный белок-партнер, слитый с GFP, а затем оценивали визуализацию обоих компонентов методом флуоресцентной микроскопии.

По итогу нами было показано, что система аптамер-флуороген подходит для визуализации РНК компонента внутриклеточных биоконденсатов SARS-CoV-2.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 24-25-00486 (https://rscf.ru/prjcard_int?24-25-00486).

Список литературы

1. Chau B.A., Chen V., Cochrane A.W. et al. Liquid-liquid phase separation of nucleocapsid proteins during SARS-CoV-2 and HIV-1 replication. *Cell Rep.* 2023;42(1):111968
2. Zhang J. Development of Genetically Encoded Near-Infrared Fluorescent Light-up Aptamers for Live-Cell RNA Imaging. Diss. 2021. doi 10.11588/heidok.00029884
3. Bychenko O.S., Khrulev A.A., Svetlova J.I. et al. Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(6):2586-2601

«Норма» как объект теории

Е.О. Селло*, О.В. Курилова, К.С. Горбунов

Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

* *sello_eo@sysbiomed.ru*

Ключевые слова: норма; референсные интервалы; клиническая диагностика; большие данные; популяция

«Norm» as theoretical concept

E.O. Sello*, O.V. Kurilova, K.S. Gorbunov

Federal Budgetary Institution of Science “Research Institute of Systems Biology and Medicine” of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia

* *sello_eo@sysbiomed.ru*

Key words: norm; reference intervals; clinical diagnostics; big data; population

В медицине «норма» – ансамбль качественных и количественных признаков, чье отсутствие означает болезнь. Статистические методы позволяют отличить нормальные признаки от аномальных. Несмотря на совершенствование математических моделей, проблема остается актуальной. Целью нашего исследования было применить современные статистические методы определения референсных интервалов показателя гемоглобина, с целью сравнения значений референсных интервалов, полученных на больших данных КДЛ для разных популяций. Дополнительно, мы провели анализ концепций, описывающих «норму» как объект теоретического интереса. Мы проанализировали показатели гемоглобина у исследуемых, сдавших анализы в 2017 г., 2 745 934 обсервации из разных регионов России. Данные были разбиты на возрастные когорты: 7–10, 10–12, 12–15, 15–18, 18–50 и 50–65 лет. Деление также было и по полу. Из набора данных были исключены ошибки ввода и обсервации, для которых коэффициент вариации, рассчитанный для двух реплик одного исследуемого, составил более 10%. Используя методы расчета Хоффмана, refineR, Kosmic, были получены верхние и нижние пороговые значения. Для регионов с большим количеством за нижним порогом значений гемоглобина был рассчитан референсный интервал и процент аномалий при региональном специфичном референсном интервале. Было также отмечено, что у женщин с 12 и до 53–55 лет вариативность в значениях гемоглобина выше, чем у мужчин. Многие возрастные группы в различных регионах укладываются в общепринятые референсные интервалы, для некоторых групп в определенных географических зонах наблюдаются скошенные и бимодальные распределения. Левоскошенные распределения показывают, что большая часть населения попадает в норму, но у части наблюдаются отклонения в сторону более низких значений. Бимодальное распределение (два пика) предполагает, что популяция состоит из двух групп: условно здоровая и «аномальная». Отмечено, что наибольшее количество отклонений сконцентрировано в кавказских регионах (Дагестан, Ингушетия, Чечня) и на севере (Якутия).
Финансирование: ГЗ №122030900062-5.

Линия клеток рака молочной железы, экспрессирующая CD44-GFP, для мониторинга дедифференцировки

А.А. Сёмчина*, А.Ю. Рыжкова, А.Г. Першина

Центр биологических исследований и биоинженерии ЦНИЛ СибГМУ, Томск, Россия

* sonjochek@mail.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; рак молочной железы; CD44; биосенсор

Breast cancer cell line expressing CD44-GFP for dedifferentiation monitoring

A.A. Syomchina*, A.Yu. Ryzhkova, A.G. Pershina

Center of Bioscience and Bioengineering of CSRL SSMU, Tomsk, Russia

* sonjochek@mail.ru

Key words: CRISPR/Cas9; breast cancer; CD44; biosensor

Образование вторичных опухолей (метастазов) – основная причина высокой летальности при многих типах раковых заболеваний [1]. Для инициации роста метастаза раковая клетка должна приобрести свойства стволовой клетки в результате дедифференцировки [1, 2]. Одним из маркеров такого перехода является экспрессия поверхностного рецептора CD44 [3].

Целью исследования было создать линию клеток рака молочной железы человека T47D, транскрибирующих ген *CD44* в виде единой мРНК с зеленым флуоресцентным белком (*eGFP*), но транслирующих белки CD44 и eGFP по отдельности.

Для получения генетически модифицированной линии была использована система CRISPR/Cas9. Донорная плаزمид была сконструирована С.П. Медведевым (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия) и содержала последовательности, кодирующие eGFP и T2A-пептид, а также ген устойчивости к антибиотику *Neo^r/Kan^r*; sgRNA были подобраны к 18 экзону гена *CD44*. Эффективность ко-трансфекции клеток T47D, согласно данным проточной цитофлуориметрии, составила $4,30\% \pm 0,06\%$. После отбора клонов, устойчивых к генетицину, успешное встраивание трансгена подтвердили с помощью ПЦР.

Полученная генетически модифицированная клеточная линия может быть использована при разработке противоопухолевых лекарств, предназначенных для лечения метастатической болезни за счет подавления процесса дедифференцировки раковых клеток [4]. Особенно актуально применение данной линии клеток в системе «орган-на-чипе», так как процесс детектирования и подсчета флуоресцентных клеток может быть автоматизирован с применением машинного обучения для интеграции искусственного интеллекта в систему.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Список литературы

1. Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. Metastasis. *Cell*. 2023;186(8):1564-1579
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46
3. Xu H., Niu M., Yuan X. et al. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):36
4. Nevskaya K.V., Pershina A.G., Hmelevskaya E.S. et al. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs. *J Med Chem*. 2024;67(7):5591-5602

Нарушение митохондриальной функции и изменение метаболомного профиля клеточной линии C2C12 на фоне отсутствия экспрессии гена *Flnc*

К.С. Сухарева*, Е.Д. Кессених, Ю.А. Власова, Е.С. Клименко, А.А. Костарева

Институт молекулярной биологии и генетики, Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

* *k.sukhareva@gmail.com*

Ключевые слова: филаминопатии; *Flnc*; метаболом; митохондрии

Mitochondrial dysfunction and metabolomic profile of *Flnc* deficient C2C12 cell line

K.S. Sukhareva*, E.D. Kessenikh, Yu.A. Vlasova, E.S. Klimenko, A.A. Kostareva

Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

* *k.sukhareva@gmail.com*

Key words: filaminopathy; *Flnc*; metabolome; mitochondria

Данная работа проводилась с целью изучения нарушения функций митохондрий и изменения метаболомного профиля в клеточной линии C2C12 на фоне нокаута гена *Flnc*. Анализ метаболитов проводился при сравнении образцов клеточной линии C2C12 *Flnc* Ко и C2C12 ДТ методами ВЭЖХ-МС и ГХМС. Нарушение митохондриальной функции оценивалось за счет измерения уровня активных форм кислорода (АФК) методом проточной цитометрии. Было выявлено, что основные метаболические последствия нокаута гена *Flnc* в клетках линии C2C12 затрагивают ключевые митохондриальные процессы. Нарушение β -окисления жирных кислот проявляется в накоплении длинноцепочечных ацилкарнитинов, таких как пальмитоилкарнитин (16:0) и стеароилкарнитин (18:0), что указывает на неполную утилизацию жирных кислот в митохондриальном матриксе. Дисфункция окислительного фосфорилирования проявляется в снижении уровней цитрата, α -кетоглутарата и фумарата в ЦТК, что отражает ограниченное поступление субстратов из-за нарушенного гликолиза и β -окисления. Митохондриальный окислительный стресс подтверждается повышением уровней как восстановленной (GSH), так и окисленной (GSSG) форм глутатиона, что отражает активацию антиоксидантных механизмов в ответ на избыточное образование АФК. Нарушение NAD^+ -зависимых процессов в митохондриях проявляется в накоплении промежуточных метаболитов, таких как никотинамидмононуклеотид (NMN), что ограничивает синтез NAD^+ и нарушает энергетический гомеостаз. Оценка уровня АФК также выявила значительное снижение уровня АФК в клетках C2C12 *Flnc* Ко на фоне разобщения дыхательной цепи с помощью FCCP. Таким образом, *Flnc* Ко приводит к глубокой митохондриальной дисфункции, что способствует развитию энергетического дефицита и окислительного стресса. Эти изменения подчеркивают критическую роль *Flnc* в поддержании митохондриального метаболизма и предлагают новые направления для изучения патогенеза филаминопатий.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, № 25-15-00552, <https://rscf.ru/project/25-15-00552/>.

Роль FAPα в регуляции функциональных свойств активированных фибробластов

А.Е. Толстолужинская*, Н.А. Басалова, М.Н. Карагяур, У.Д. Дьячкова, М.А. Виговский, Д.А. Бутузова, М.А. Кулебякина, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко

Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* tolstoluzhinskaya@my.msu.ru

Ключевые слова: FAPα; фиброз; активированные фибробласты

The role of FAP in regulating the functional properties of activated fibroblasts

A.E. Tolstoluzhinskaya*, N.A. Basalova, M.N. Karagyaour, U.D. Dyachkova, M.A. Vigovsky,

D.A. Butuzova, M.A. Kulebyakina, O.A. Grigorieva, A.Yu. Efimenko

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov MSU, Moscow, Russia

* tolstoluzhinskaya@my.msu.ru

Key words: FAPα; fibrosis; activated fibroblasts

При фиброзе происходит дифференцировка стромальных клеток-предшественников, в миофибробласты, которые активно секретируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и ремоделируют его. Фибробласты не сразу дифференцируются в миофибробласты, а сначала проходят стадию активации, приобретают способность к повышенной инвазии и пролиферации и экспрессируют белок активации фибробластов α (FAPα) – мембранную сепаразу, функции которой до конца не известны. Поэтому целью работы было изучение роли FAPα в регуляции функциональных свойств активированных фибробластов при фиброзе.

На срезах легких мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом уже на ранних стадиях развития фиброза были обнаружены FAPα⁺ активированные фибробласты, в которых зачастую детектировали маркеры пролиферации (PCNA) и миофибробластов (αSMA), окруженных большим количеством ВКМ. Для того, чтобы уточнить вклад FAPα в регуляцию функциональных свойств клеток, были получены линии фибробластов человека с нокаутом (CRISPR/cas9, модифицированный в никазу) и гиперэкспрессией FAPα. Нокаут FAPα в линиях фибробластов легких оказался летальным для культуры, а в фибробластах дермы приводил к сильному снижению пролиферации по сравнению с контролем. Гиперэкспрессия FAPα путем лентивирусной трансдукции вектором, несущим целевой ген под промотором EF-1α, вызывала увеличение секреции белка клетками, а также скорости пролиферации более чем в 2 раза. Направленные изменения экспрессии FAPα в фибробластах оказывали влияние на дифференцировку клеток в миофибробласты *in vitro*, причем гиперэкспрессия приводила к активации дифференцировки на ранних сроках после индукции с помощью TGFβ, а нокаут этого белка вызывал снижение накопления αSMA через 4 дня после индукции дифференцировки.

Таким образом, на моделях *in vivo* и *in vitro* мы показали, что FAPα может играть важную роль в развитии фиброза. Полученные результаты необходимы для понимания функций FAPα⁺ активированных фибробластов при фиброзе.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ, № 23-15-00198, <https://rscf.ru/en/project/23-15-00198/>.

Генетические и эпигенетические исследования в изучении патогенеза и терапии сахарного диабета 2 типа

З.Н. Тонян*, А.А. Ткаченко, Ю.А. Насыхова, Ю.А. Барбитов, Я.Н. Ренев, М.М. Данилова, А.А. Михайлова, А.С. Готов

ФГБНУ «НИИ АГуР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

* ziravard@yandex.ru

Ключевые слова: диабет 2 типа; микроРНК; метформин; транскриптом

Genetic and epigenetic studies in the investigation of the pathogenesis and therapy of type 2 diabetes

Z.N. Tonyan*, A.A. Tkachenko, Y.A. Nasykhova, Y.A. Barbitoff, I.N. Renev, M.M. Danilova, A.A. Mikhailova, A.S. Glotov

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

* ziravard@yandex.ru

Key words: type 2 diabetes; microRNA; metformin; transcriptome

Было проведено комплексное исследование, посвященное анализу эпигенетических факторов риска развития сахарного диабета 2 типа (СД2), а также генетических факторов, влияющих на эффективность терапии метформином. Были проанализированы профили экспрессии миРНК в плазме 44 пациентов с СД2 и 22 здоровых лиц. Выявлено 229 дифференциально экспрессированных миРНК, среди которых в плазме пациентов были увеличены уровни miR-5588-5p, miR-125b-2-3p и miR-1284, а уровень miR-496 снижен. Также было установлено, что у пациентов с избыточным весом наблюдается дифференциальная экспрессия miR-144-3p и miR-99a-5p. Функциональный анализ таргетных генов показал обогащение путей, связанных с хроматин-модифицирующими ферментами и апоптозом. Транскриптомный анализ, проведенный на цельной крови 8 пациентов с СД2 и 8 здоровых лиц выявил 146 генов с дифференциальной экспрессией, 71 из которых с повышенной, а 75 – со сниженной экспрессией. Анализ обогащения детектированных генов по функциональной принадлежности также показал их вовлечение в процессы, ассоциированные с апоптозом, контролем клеточного цикла и модификацией хроматина. При оценке роли генетических полиморфизмов в ответе на терапию метформином у 299 пациентов с СД2 выявлено, что вариант rs12208357 в гене *SLC22A1* существенно влияет на эффективность лечения: носители генотипа ТТ демонстрировали более низкий ответ на терапию по сравнению с СС/СТ носителями. Для прогнозирования ответа на лечение была создана модель машинного обучения, которая показала наивысшую точность при использовании четырех параметров: пол, генотип rs12208357, наличие семейной истории Т2Д и соотношение талии к бедрам (WHR), с AUC = 0.62.

Молекулярные последствия CRISPR/Cas9-редактирования дубликации гена *STAG2*

М.И. Тубалова^{1,2*}, Г.С. Кокшарова³, М.М. Гридина^{1,2,3}, С. Коста⁴, А. Крепичи⁴, В.С. Фишман^{1,2,3}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

⁴ Университет Сан-Пауло, Сан-Пауло, Бразилия

* m.tubalova@g.nsu.ru

Ключевые слова: 3D-геномика; регуляция генов; индуцированные плюрипотентные клетки

The molecular consequences of CRISPR/Cas9-mediated editing of the duplicated *STAG2* gene

M.I. Tubalova^{1,2*}, G.S. Koksharova³, M.M. Gridina^{1,2,3}, S. Costa⁴, A. Krepischi⁴, V.S. Fishman^{1,2,3}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

⁴ University of Sao-Paulo, Sao-Paulo, Brazil

* m.tubalova@g.nsu.ru

Key words: 3D-genomics; gene regulation; induced pluripotent stem cells

STAG2 – ключевой компонент комплекса когезина. Мутации в гене *STAG2* могут приводить к развитию когезинопатий. Нами описаны два брата с когезинопатией. Метод аCGH выявил у них микродубликацию *Xq25* длиной 418 кб, в состав которой входил один полноразмерный ген – *STAG2*. Механизм развития данной патологии и роль сверхэкспрессии *STAG2* неясны.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – хорошая модель для изучения механизмов развития заболеваний. Изогенные линии ИПСК позволяют минимизировать вариабельность, связанную с генетическим фоном. Мы запланировали эксперимент по «геномной коррекции», внося в ИПСК пациентов сдвиг рамки считывания в одну из копий гена *STAG2*, используя CRISPR/Cas9.

В 48 из 87 клонов была выявлена только одна геномная модификация. Мы предположили, что геномное редактирование привело к появлению идентичных мутаций. Однако в результате проведенного анализа транскриптома 10 клонов у 3 выявлено несоответствие между геномными модификациями и отсутствием экспрессии *STAG2*. Для более детального понимания структуры мутаций было проведено таргетное секвенирование. Выяснилось, что в 4 из 10 клонов в одну из копий встроились фрагменты плазмиды, содержащей Cas9, а в двух случаях произошли инверсии.

Наша работа подчеркивает, что детальный анализ локусов внесения разрывов при использовании CRISPR/Cas9 необходим для предотвращения неверной интерпретации результатов. Мы предложили эффективный метод анализа локусов редактирования, позволяющий определить структуру возникших перестроек, которую не видно при стандартном генотипировании с использованием ПЦР.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539 от 24.04.2024) и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (FWNR-2025-0017).

Применение системы CRISPR/Cas9 для получения репортерных плазмид и исследование мутагенеза, вызванного 8-оксогуанином, *in vitro* и *in vivo*

М.С. Чуприкова^{1*}, А.В. Юдкина¹, Д.О. Жарков^{1, 2}

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* ms.chuprikova@gmail.com

Ключевые слова: Cas9-никазы; репликация; репарация; точность

Application of the CRISPR/Cas9 system for the generation of reporter plasmids and the investigation of 8-oxoguanine-induced mutagenesis *in vitro* and *in vivo*

M.S. Chuprikova^{1*}, A.V. Yudkina¹, D.O. Zharkov^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* ms.chuprikova@gmail.com

Key words: Cas9-nickases; replication; repair; fidelity

Окислительные повреждения ДНК, в частности 8-оксогуанин (8-охоG), входят в число основных источников мутаций в геноме всех живых организмов. Для изучения репарации поврежденных оснований ДНК в живых клетках можно применять репортерные плазмиды с однонуклеотидными модификациями. Наиболее эффективный способ получения таких конструкций основан на внесении двух близко расположенных одноцепочечных разрывов на одной из цепей ДНК с помощью ДНК-никаз. Но данный метод ограничен узким спектром сайтов узнавания ДНК-никаз и поэтому не позволяет нацеливать их на любой желаемый регион. В ходе работы для получения репортеров с модификациями в произвольных сайтах адаптирована система Cas9-никаз, которая ограничена лишь мотивом PAM.

У плазмид с репликоном ColE1 в инициации репликации участвует ДНК-полимераза I. Синтезировав около 400 нуклеотидов отстающей цепи, она уступает место ДНК-полимеразе III. Таким образом, введение поврежденного основания (8-охоG) при помощи Cas9-никаз в данную область плазмиды позволяет исследовать мутагенез с участием ДНК-полимеразы I при прохождении повреждения в условиях *in vivo*.

Имеющиеся в литературе количественные данные о точности ДНК-полимераз *in vitro* в подавляющем большинстве получены на простейших субстратах вида «праймер–матрица», что не позволяет оценить вклад процессов синтеза с вытеснением цепи, которые часто встречаются в живой клетке при репликации и репарации. В данной работе исследована точность ДНК-полимеразы I (полноразмерной и фрагмента Кленова) на субстратах с вытесняемой ДНК- и РНК-цепью, идентичных по своей последовательности участку первого фрагмента Оказаки плазмиды pUC19. Показано, что точность включения нуклеотидов напротив 8-охоG зависит от присутствия и структуры вытесняемой цепи. Впервые проведено сравнение мутагенеза, вызванного 8-охоG, для ДНК-полимеразы I *E. coli* в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ, № 24-14-00285.

Влияние мутации c.7416_7418delGAA в гене *FLNC*, ассоциированной с рестриктивной кардиомиопатией, на хондрогенную дифференцировку в пациент-специфичной 3D модели хрящевой ткани

М.Ю. Шарикова*, Д.В. Голиусова, О.С. Лебедева, А.Н. Богомазова

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина

Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

* sharikova.marg@yandex.ru

Ключевые слова: рестриктивная кардиомиопатия; ген *FLNC*; филамин C; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); хондроциты; органоиды хряща

Effect of the c.7416_7418delGAA mutation in the *FLNC* gene associated with restrictive cardiomyopathy on chondrogenic differentiation in a patient-specific 3D model of cartilage

M.Y. Sharikova*, D.V. Goliusova, O.S. Lebedeva, A.N. Bogomazova

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

* sharikova.marg@yandex.ru

Key words: restrictive cardiomyopathy; *FLNC* gene; filamin C; induced pluripotent stem cells (iPSCs); chondrocytes; cartilage organoids

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – это орфанная патология миокарда, часто связанная с мутациями генов цитоскелетных и саркомерных белков, в частности гена актин-связывающего белка филамина C (*FLNC*). При *FLNC*-РКМП с ранней манифестацией у пациентов отмечаются нарушения опорно-двигательного аппарата, сочетанные с повреждением миокарда. Целью данного исследования являлась оценка влияния гетерозиготной делеции c.7416_7418delGAA в гене *FLNC* на характеристики хондроцитов в клеточной модели хрящевой ткани, полученной *in vitro* путем хондрогенной дифференцировки ИПСК пациента с исследуемой мутацией и ИПСК неродственных здоровых доноров и последующего формирования органоидов хряща в условиях биореактора. В качестве контроля были использованы первичная культура хондроцитов человека, культивируемых в 2D условиях, и сформированные из них хондросферы, культивируемые в условиях биореактора. В полученной клеточной модели ген *FLNC* экспрессируется на высоком уровне. Было обнаружено снижение уровня экспрессии ключевых маркеров хондрогенной дифференцировки (*ACAN*, *COL1A2*, *COL2A1*) в хондроцитах с исследуемой мутацией относительно хондроцитов одного здорового донора. В составе органоидов с мутацией наблюдалась тенденция к сохранению недифференцированных клеток, экспрессирующих маркеры ИПСК (*OCT4*, *SALL4*, *SPP1*). В совокупности полученные данные указывают на участие филамина C в хондрогенной дифференцировке и демонстрируют потенциальную роль мутаций *FLNC* в развитии патологий хряща у пациентов с *FLNC*-РКМП. **Финансирование:** Исследование выполнено в рамках государственного задания «Органоид сердца 25-27», номер государственного учета НИОКТР 125030703325-7.

Тест-система для детекции хромосомных перестроек с использованием *in vitro* cleavage assay на основе нуклеазы Cas12a

В.В. Шептий, А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* brouskin@vigg.ru

Ключевые слова: Cas12a; молекулярная диагностика; разрезание *in vitro*

In vitro cleavage assay for the detection of chromosomal rearrangements in clinical samples using Cas12a nuclease

V.V. Sheptiy, A.D. Zolotareno, S.A. Bruskin*

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* brouskin@vigg.ru

Key words: Cas12a; molecular diagnostics; *in vitro* cleavage assay

Развитие методов геномного редактирования на основе систем CRISPR/Cas открывает новые горизонты в молекулярной диагностике. В частности, использование программируемых нуклеаз для проведения диагностики *in vitro* позволило разработать такие специфичные и высокочувствительные инструменты, как DETECTR (на основе нуклеазы Cas12a) и SHERLOCK (на основе Cas13), для определения присутствия целевой (например, вирусной) нуклеиновой кислоты в образце.

В рамках данного проекта мы разработали прототип диагностической платформы для детекции хромосомных перестроек, который основан на *in vitro* cleavage assay с применением рекомбинантного белка Cas12a. В отличие от систем на основе Cas9, Cas12a работает с одной направляющей РНК, что упрощает дизайн и производство реагентов. Предлагаемая тест-система позволяет выявить мутации: хромосомные перестройки, инсерции и делеции – в клинических образцах.

Система основана на детекции сайта-мишени с помощью направляющей РНК, его разрезании с образованием липких концов, обогащении смеси целевыми фрагментами, приготовлении библиотеки и последующем высокопроизводительном секвенировании. Анализ результатов секвенирования позволяет не только подтвердить наличие перестройки, но и оценить ее представленность в образце, что является критическим преимуществом по сравнению с классическими методами. За счет применения нуклеазы Cas12a, образующей в ходе редактирования липкие концы, лигирование адаптеров происходит более эффективно, что делает систему более экономичной.

В ходе реализации разработки было проведено тестирование активности полученного рекомбинантного белка и направляющих РНК на синтетической матрице путем *in vitro* cleavage assay. Анализ подтвердил активность и специфичность разработанной системы. Таким образом, система детекции на основе Cas12a представляет собой перспективную альтернативу существующим подходам для детекции хромосомных перестроек, обеспечивая высокую точность и возможность количественной оценки.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.

Создание инструментов прайм-редактирования генетического варианта c.2080A>G (p.Met694Val) в гене MEVF ассоциированного с развитием семейной средиземноморской лихорадки

А.В. Шубкин^{1,2*}, Е.Р. Никитин^{1,2}, Л.В. Карапетян³, С.В. Павлова¹, С.М. Закиан¹, С.П. Медведев¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт биомедицины и фармации РАУ, Ереван, Армения

* a.shubkin@g.nsu.ru

Ключевые слова: MEVF; прайм-редактирование; семейная средиземноморская лихорадка

Development of prime-editing tools for the genetic variant c.2080A>G (p.Met694Val) in the MEVF gene associated with familial mediterranean fever

A.V. Shubkin^{1,2*}, E.R. Nikitin^{1,2}, L.V. Karapetyan³, S.V. Pavlova¹, S.M. Zakian¹, S.P. Medvedev¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Biomedicine and Pharmacy, RAU, Yerevan, Armenia

* a.shubkin@g.nsu.ru

Key words: MEVF; prime editing; mediterranean fever

Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) – это аутовоспалительное заболевание, характеризующееся периодическими приступами лихорадки и системного воспаления, обусловленное мутациями в гене *MEFV*. Продукт гена *MEFV*, белок пирин, является ключевым компонентом инфламмасом – мультибелковых комплексов, ответственных за активацию и секрецию провоспалительных интерлейкинов, прежде всего IL-1 β . Патогенный вариант p.Met694Val (c.2080A>G, rs61752717) нарушает регуляторную функцию пирина, что приводит к гиперактивации инфламмасом, неконтролируемой секреции IL-1 β и развитию системного воспаления. Хроническое воспаление при ССЛ является основным фактором риска развития АА-амилоидоза с последующей органной недостаточностью.

Целью данного исследования является создание изогенной модели ИПСК-производных макрофагов для изучения влияния варианта c.2080A>G (rs61752717, p.Met694Val) на сборку инфламмасом и последующую секрецию IL-1 β , лежащие в основе патогенеза ССЛ.

Для внесения и исправления генетического варианта c.2080A>G в гене *MEFV* в ИПСК человека с помощью технологии прайм-редактирования был проведен дизайн регРНК помощью программы PE-Designer. Были созданы плазмидные конструкции, предназначенные для экспрессии регРНК (для исправления и внесения патогенного генетического варианта), совместно с красным флуоресцентным белком mCherry. Кроме того, для увеличения эффективности прайм-редактирования были созданы плазмиды для совместной экспрессии ngРНК, а также белков TagBFP (синий флуоресцентный белок), mp53DD и hMLH1dn. Полученные конструкции могут быть применены совместно с белком-редактором PEmax, экспрессия которого маркирована флуоресцентным белком EGFP.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке КВОН МОНКС РА в рамках научного проекта №25YR-1F023.

Ингибиторы BET-белков на основе ретроинвертированных пептидов

М.С. Юдин^{1,2*}, С.Э. Алиева¹, В.В. Северов¹, В.Б. Цветков¹

¹ *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия*

² *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

* *iudin.ms@phystech.edu*

Ключевые слова: ингибиторы BET-белков; ретроинвертированные пептиды

BET-proteins inhibitors, based on retro-inverso peptides

M.S. Iudin^{1,2*}, S.E. Alieva¹, V.V. Severov¹, V.B. Tsvetkov¹

¹ *Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia*

² *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

* *iudin.ms@phystech.edu*

Key words: BET protein inhibitors; retro-inverso peptides

Белки семейства BET – важные регуляторы транскрипции. Они содержат 2 бромодомена (BD), ET-домен, несколько консервативных мотивов и в случае BRD4 и BRDT – С-концевой мотив. Их регуляторная роль реализуется благодаря способности BD узнавать КасХХКас-мотивы гистонов в регуляторных участках хроматина, а также способности аккумулировать на этих участках транскрипционные факторы за счет BD или других доменов/мотивов. BET-белки являются значимыми мишенями для терапии ряда онкозаболеваний, а также заболеваний, ассоциированных с хроническим воспалением. Ингибиторы BET, связывающие BD, проходят испытания как противоопухолевые и противовоспалительные агенты. Большинство из них обладает пан-BD ингибиторной активностью, что обуславливает значительную токсичность.

Целью работы является получение ингибиторов, аффинных к определенному BET-белку и BD, на основе фрагментов ацетилированных гистонов. В недавнем исследовании был представлен новый класс подобных ингибиторов – циклические пептиды, селективно связывающие BD1 или BD2. Нами предложен альтернативный дизайн пептидных ингибиторов. За основу взят ряд (ди)ацетилированных фрагментов N-концевых участков гистонов. Были получены их *in silico* модели, а также их ретроинвертированных аналогов для обеспечения устойчивости ингибитора BET к гидролизу. Симуляция молекулярной динамики показала, что последние связывают BD не хуже нативных пептидов. Результаты *in silico* анализа подтверждены *in vitro* с помощью метода на основе поверхностного плазмонного резонанса.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 24-25-00431 «Ингибиторы BET-белков на основе ретроинвертированных пептидов».

Новые пептидные ингибиторы амилоидизации альфа-синукленина

М.С. Юдин^{1,2*}, А.М. Варижук^{1,2}, В.А. Манувера^{1,2}, К.А. Бровина^{1,2}, С.Э. Алиева¹,
Н.А. Баринов¹, Д.Н. Клинов^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

* iudin.ms@phystech.edu

Ключевые слова: альфа-синуклеин; амилоидизация; синуклеинопатии; пептидный ингибитор

Novel peptide inhibitors of alpha-synuclein amyloidization

M. Iudin^{1,2*}, A. Varizhuk^{1,2}, V.A. Manuvera^{1,2}, K.A. Brovina^{1,2}, S.E. Alieva¹, N.A. Barinov¹,
D.N. Klinov^{1,2}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

* iudin.ms@phystech.edu

Key words: alpha-synuclein; amyloidization; synucleinopathies; peptide inhibitor

Альфа-синуклеин (SNCA) является регулятором слияния мембран и высвобождения нейромедиаторов из пресинаптических везикул. В норме его N-концевой участок взаимодействует с липидами и имеет альфа-спиральную укладку, тогда как центральный и C-концевой фрагменты конформационно не упорядочены. Наличие мутаций в центральном фрагменте и ряд иных факторов повышают риск олигомеризации SNCA с образованием аморфных агрегатов и кросс-бета структур амилоидного типа – фибрилл. SNCA агрегирует с образованием нерастворимых фибрилл при патологических состояниях, таких как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви и множественная системная атрофия и другие синуклеинопатии.

Для предотвращения процесса амилоидизации SNCA применимы синтетические пептиды. Общий принцип их дизайна сводится к отбору коротких последовательностей, конкурирующих с бета-листами из ядра фибрилл за другие бета-листы SNCA и таким образом нарушающих кросс-бета укладку. На основании данных о конформациях всех типов фибрилл SNCA нами были разработаны природный пептид и его ретроинвертированный аналог, потенциально ингибирующие амилоидизацию большинства мутантов SNCA и не оказывающие активирующего действия ни на один из них.

Данные пептиды, а также контрольные пептиды, были протестированы с различными мутантными вариантами SNCA, встречающимися у пациентов с болезнью Паркинсона, а также с белком дикого типа. Образование фибрилл отслеживали методом флуориметрии с флуорогенным зондом на амилоиды и верифицировали методом атомно-силовой микроскопии. Результаты подтвердили эффективность природного пептида. Он не уступал лидеру из числа природных по ингибиторной активности в отношении мутанта SNCA E46K (60%) и превосходил его с прочими мутантами (98% ингибирования).

Финансирование: Исследование поддержано ГЗ № 17.002.24.800 «Шаперон».

Экспрессия Nef в миелоидных клетках вызывает нарушения функций макрофагов, системное воспаление и спонтанные опухоли у мышей

А.С. Яковлева^{1,2}, Е.А. Горшкова¹, Е.О. Губернаторова¹, М.И. Букринский³, С.А. Недоспасов^{1,2,4}, М.С. Друцкая^{1,2,4*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Кафедра микробиологии, иммунологии и тропической медицины, Медицинская школа и наук о здоровье Университета Джорджа Вашингтона, Вашингтон, округ Колумбия, США

⁴ Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

* marinadru@gmail.com

Ключевые слова: Nef-трансгенные мыши; ВИЧ-ассоциированные заболевания

Nef expression in myeloid cells impairs macrophage functions, drives systemic inflammation and spontaneous tumor formation in mice

A.S. Yakovleva^{1,2}, E.A. Gorshkova¹, E.O. Gubernatorova¹, M.I. Bukrinsky³, S.A. Nedospasov^{1,2,4}, M.S. Drutskaya^{1,2,4*}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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

³ Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, The George Washington University School of Medicine and Health Sciences, Washington, District of Columbia, USA

⁴ Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Krasnodarsky krai, Russia

* marinadru@gmail.com

Key words: Nef-transgenic mice; HIV-associated disease

Вирусный белок Nef оказывает множество патогенных эффектов на иммунную систему у ВИЧ-инфицированных пациентов. Nef регулирует экспрессию МНСI, МНСII, CD4 и CD28, подавляет отток холестерина, изменяет продукцию цитокинов, накапливается в опухолях. Миелоидные клетки служат резервуарами вируса, являясь основным источником Nef-содержащих внеклеточных везикул в крови пациентов с ВИЧ. Для исследования последствий экспрессии Nef миелоидными клетками, были созданы трансгенные мыши с Cre-зависимой экспрессией Nef и репортерного белка GFP в миелоидных клетках (Nef-Tg LysM-Cre). Макрофаги от Nef-Tg LysM-Cre мышей имели ряд функциональных нарушений. Анализ *in vivo* показал наибольшую экспрессию Nef в сердце и мозге. У трансгенных мышей наблюдались нейтрофилия, повышенная продукция IL-6, IL-13, G-CSF, CXCL1 и другие признаки системного воспаления. В возрасте от 5 до 11 месяцев у всех Nef-трансгенных мышей развивались спонтанные злокачественные новообразования из вибрисс с метастазами в печень и легкие. Фенотип, наблюдаемый у мышей Nef-Tg LysM-Cre, демонстрирует, что Nef, продуцируемый миелоидными клетками, нарушает их функциональные свойства, стимулирует системное воспаление и опухолеобразование. *Финансирование:* Исследование поддержано грантом РНФ № 25-15-00508.

Screening of GPI-anchored 2P23 peptide library identified new anti-HIV peptide fusion inhibitors

S.E. Borovikova^{1*}, E.A. Tiukacheva¹, A.V. Luzhin¹, S.V. Ulianov¹, D.V. Mazurov², M.V. Shepelev¹, N.A. Kruglova¹

¹ *Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

² *Yale School of Medicine, New Haven, USA*

* *borovikova_sofiya@mail.ru*

Key words: human immunodeficiency virus (HIV); fusion inhibitors; knock-in; peptide library

Finding a cure for HIV remains a major challenge. Gene therapy offers a promising approach, where patient cells are extracted, modified *ex vivo*, and reintroduced. One particularly effective method involves integrating constructs for membrane-anchored HIV fusion inhibitors (e.g., 2P23 and MT-C34), which block viral entry by preventing membrane fusion, thus protecting cells from infection.

Previously, our laboratory developed a construct for expressing fusion inhibitory peptides by embedding them into a short GPI-anchored CD52 molecule, thereby localizing them to the plasma membrane [1]. Cells expressing membrane-bound MT-C34 were fully protected from infection, while those with 2P23 showed weaker protection. We hypothesized that this difference could be explained by an N-glycosylation site present in MT-C34 and absent in 2P23, which may enhance membrane protein stability.

In this study, we introduced N-glycosylation motifs (NDT) at the N-, C-terminus, or both ends of 2P23. We cloned NDT-motif peptides into previously designed CD52-based constructs for membrane peptide export and delivered them to CEM/CCR5 cells via lentiviral transduction or CRISPR/Cas9-mediated knock-in into the *CXCR4* exon 2 locus. The surface levels of 2P23 and NDT-2P23 were the same, while 2P23-NDT and NDT-2P23-NDT showed a stepwise increase in membrane expression. However, only NDT-2P23-NDT achieved MT-C34-equivalent protection.

To discover improved 2P23 variants, we generated a 2P23 peptide library with randomized N-/C-terminal residues (NNK codons) and transduced it into HEK 293T/CD4/CCR5 and CEM/CCR5 cells. Library-expressing cells were FACS-sorted, challenged with replication-competent HIV, and analyzed by NGS to identify protective peptides. Twelve peptides were selected for further testing. Five peptides showed increased surface expression and higher protective levels compared to 2P23. The protective efficacy of these peptides will be further evaluated in infection tests with replication-competent HIV.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-15-00381-P.

References

1. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S. et al. Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41. *mBio*. 2022;13(1):e0358921. doi 10.1128/mbio.03589-21

Micronuclei levels in doxorubicin- and mitomycin C-treated MRC-5 and HeLa cells with knockdown of the histone *H1-5* gene

T. Harutyunyan^{1,2*}, A. Sargsyan^{1,2}, G. Tadevosyan³, L. Kalashyan¹, R. Aroutiounian^{1,2}, G. Hovhannisyan^{1,2}

¹Laboratory of General and Molecular Genetics, Research Institute of Biology, Yerevan State University, Yerevan, Armenia

²Department of Genetics and Cytology, Yerevan State University, Yerevan, Armenia

³Laboratory of Cell Technologies, Institute of Molecular Biology, NAS RA, Yerevan, Armenia

* tigranharutyunyan@ysu.am

Key words: linker histone H1-5; CRISPR-Cas9; CBMN assay; comet assay

H1 binding stabilizes nucleosomes and promotes higher-order chromatin compaction while its depletion leads to chromatin relaxation [1] and potentially increased DNA vulnerability. Salinas-Pena et al. [2] have challenged the idea of functional redundancy among H1 variants, emphasizing the distinct role of H1.5 in chromatin organization and genome stability. However, its involvement in cellular responses to mutagens remains poorly understood.

Here we examined the genotoxic effects of doxorubicin (DOX) and mitomycin C (MMC) in MRC-5 and HeLa cells following *H1-5* knockdown (KD) via CRISPR-Cas9.

To ensure that observed DNA damage was not confounded by cytotoxicity, cell viability was assessed prior to genotoxicity testing using MTT and trypan blue exclusion tests. Based on these data, non-cytotoxic concentrations were used in the subsequent micronucleus (MN) and comet assays.

H1-5 KD significantly increased spontaneous MNi frequency: from 9.5 ± 0.7 ‰ to 18.0 ± 2.8 ‰ in MRC-5, and from 14.0 ± 1.4 to 31.0 ± 1.4 ‰ in HeLa cells. DOX (0.0175–0.07 µg/ml) and MMC (0.01–0.1 µg/ml) treatments led to dose-dependent increases in MNi, with consistently higher levels in KD than WT cells. Comet assay results showed a similar pattern, with increased DNA damage (% DNA in tail) in KD cells.

Our preliminary findings suggest that *H1-5* knockdown may enhance spontaneous and drug-induced DNA and chromosome damage in normal and cancer cells. This may reflect a role for histone H1.5 in maintaining genome integrity, though further validation is needed. Understanding of how histone depletion affects the genotoxic response to antitumor agents may help in the development of strategies to minimize adverse effects in cells with *H1-5* gene alterations.

Funding: The study is supported by the HESC of the MESCS of the RA (No. 21AG-1F068; No. 24AA-1F057), and jointly by the BMBF (No. 22SC-BMBF-1C001).

References

1. Yusufova N. et al. Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature*. 2021;589(7841):299-305
2. Salinas-Pena M. et al. Imaging analysis of six human histone H1 variants reveals universal enrichment of H1.2, H1.3, and H1.5 at the nuclear periphery and nucleolar H1X presence. *elife*. 2024;12:RP91306

***In vitro* characterization of a novel type II CRISPR-Cas system KiCas9**

M.S. Liashchenko¹, A.A. Vasileva², D.A. Kretov², M.V. Abramova², T.A. Zair-Bek²,
M.A. Khodorkovskii², A.N. Arseniev^{2*}

¹ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

* arsenievanatoly@gmail.com

Key words: CRISPR; Cas9; nuclease

CRISPR-Cas systems represent a powerful tool for editing the genomes of various organisms, including humans and animals. However, currently used systems have significant limitations related to the narrow range of recognizable PAM sequences (5'-NGG-3' for SpCas9) and the large size of effector proteins (160 kDa for SpCas9) [1]. To expand the genome editing toolkit, it is critically important to broaden the spectrum of utilized systems by searching for and studying new orthologs of effector proteins.

This study investigates a novel type II CRISPR-Cas system – KiCas9, discovered in bacteria of the genus *Kiritimatiella*. For the functional characterization of the system, the recombinant effector protein KiCas9 (size 120 kDa) was obtained, and crRNA, tracrRNA, and single guide RNA (sgRNA) were designed and synthesized to perform *in vitro* reactions.

The research results confirmed the nuclease activity of the KiCas9 protein *in vitro*. The highest DNA cleavage efficiency was observed when using the engineered sgRNA and a DNA template containing the PAM sequence 5'-TAACAC-3'. The optimal conditions for the nuclease's function were determined: the most effective temperature range is 35–42°C, which is optimal for potential work in mammalian cells. An interesting feature of the KiCas9 PAM sequence is that it can potentially encode stop codons, which theoretically allows the use of the KiCas9 system for the efficient design of expression genetic constructs.

References

1. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi 10.1126/science.1225829

Analysis of a Cas4-like nuclease associated with the Argonaute protein from a mesophilic bacterium

L.A. Lisitskaya*, M.K. Alieva, V.A. Panteleev, D.M. Gelfenbein, A.V. Kulbachinskiy

Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia

* *lisidiya@gmail.com*

Key words: Argonaute protein; Cas4 family nuclease; prokaryotic immunity

Argonaute proteins (Ago) are the central components of the RNA interference machinery in eukaryotes. Homologous proteins have also been discovered in bacteria and archaea. Prokaryotic Argonautes (pAgos) are an expanding family of programmable nucleases that use small guide oligonucleotides to recognize target nucleic acids. Like prokaryotic CRISPR-Cas systems, pAgos act as innate immune systems of host cells, protecting them from invading nucleic acids (bacteriophages and plasmids). In contrast to eukaryotic Ago proteins, most studied pAgo nucleases bind DNA guides and cleave target DNA, but we have recently described pAgos that have a unique specificity for RNA targets.

In this study, we have investigated a putative nuclease from the PD-(D/E)xK superfamily that belongs to the Cas4 family and is encoded in one operon with an RNA-targeting pAgo nuclease. The enzymatic activity of the Cas4 proteins associated with pAgos has not been fully characterized. Although the co-occurrence of pAgos and Cas4-like nucleases suggests a functional link between these proteins, the biological significance and molecular mechanisms underlying this potential functional association remain unknown.

We co-expressed the Cas4-like nuclease with the pAgo protein in *Escherichia coli*, purified the proteins and showed that they form a heterodimeric complex. We investigated the activity of Cas4-like nuclease and its catalytic mutant in complexes with pAgo *in vitro*. It has been shown that the nuclease can cleave single-stranded DNA substrates and possesses 3'-5' exonuclease activity, depending on the divalent cations Mn^{2+} or Mg^{2+} . The efficacy of cleavage depends on the length and sequence of ssDNA substrates, indicating possible preference of the nuclease for specific substrate structure and sequence motifs. The nuclease is active over a broad temperature range from 15 to 55 °C, with optimum at 37 °C. The nuclease activity leads to the formation of additional products through hydrolytic cleavage of the target RNA by pAgo. We show that the nuclease can participate to the generation and trimming of guide DNAs used by pAgo, resulting in changes in the pattern of RNA cleavage product generated by pAgo *in vitro*. *In vivo*, Cas4-nuclease and pAgo act in conjunction to provide defense against bacteriophages. In conclusion, the results suggest that Cas4-nucleases may cooperate with pAgo proteins in generating specific guide DNAs and protecting bacterial cells from invaders.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (22-14-00182-P).

Transcriptomic analysis of CRISPR-Cas9 knock-in mice with the patient-specific *FLNC* c.7416_7418delGAA mutation linked to restrictive cardiomyopathy

E.A. Lunev^{1,2*}, I.I. Galkin^{1,2}, M.Y. Shubina^{1,2}, A.V. Deykin³, T.V. Egorova^{1,2}, M.V. Bardina^{1,2}

¹ Laboratory of Modeling and Gene Therapy of Hereditary Diseases, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Marlin Biotech, Sochi, Russia

³ Laboratory of Genetic Technologies and Genome Editing for Biomedicine and Animal Health, Joint Center for Genetic Technologies, Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

* e.lunev.marlin@gmail.com

Key words: *FLNC*; restrictive cardiomyopathy; CRISPR-Cas9 knock-in mice; RNA-seq

Restrictive cardiomyopathy (RCM) is a severe rare myocardial disease with a poor clinical prognosis. A novel heterozygous in-frame deletion in *FLNC* (c.7416_7418delGAA) was recently identified in a pediatric patient diagnosed with RCM. This mutation is hypothesized to exert a dominant-negative effect, potentially impairing the normal function of the Filamin C protein. To study disease mechanisms and evaluate gene therapy approaches, we previously generated a knock-in mouse model carrying this *FLNC* mutation using CRISPR-Cas9 genome editing. In the present study, we performed RNAseq analysis of cardiac tissue from mutant and wild-type mice to investigate gene expression changes associated with the pathogenic *FLNC* variant. Differential gene expression analysis identified 178 genes, with KEGG enrichment analysis indicating transcriptional changes associated with ECM-receptor interaction (mmu04512), muscle cell cytoskeleton (mmu04820), focal adhesion (mmu04510), and ABC transporters (mmu02010). We then evaluated alternative splicing and detected a total of 63 differential splicing events, including 43 exon skipping (SE), 5 alternative 5' splice site (A5SS), 9 alternative 3' splice site (A3SS), 2 mutually exclusive exon (MXE), and 4 retained intron (RI) events. Notably, genes affected by alternative splicing, including *DEPDC5* (A3SS, SE), *Myh7* (A5SS), and *MYRF* (SE), were associated with biventricular hypertrophy (HP:0200128) according to the Human Phenotype Ontology database. Thus, RNA-seq analysis of cardiac tissue from *FLNC* c.7416_7418delGAA knock-in mice revealed significant alterations in gene expression and splicing patterns. Further studies are required to clarify their association with the cardiomyopathy phenotype and to determine the biological significance of these changes.

Association between urokinase receptor gene *PLAUR* polymorphisms and negative symptom subdomains in schizophrenia

V.A. Mikhailova*, T.V. Lezheiko, V.E. Golimbet, Yu.A. Chaika, E.V. Semina

Mental Health Research Center, Moscow, Russia

*vera.mikhailova.med@gmail.com

Key words: schizophrenia; negative symptoms; *PLAUR*; neuroinflammation; perinatal adversity

Negative symptoms in schizophrenia – particularly avolition/apathy (AA) and diminished expression (DE) – are linked to disability and poor treatment response. Recent findings suggest involvement of neuroinflammatory pathways. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), encoded by *PLAUR*, modulates neuroinflammation, neurodevelopment, and extracellular matrix remodeling–processes relevant to schizophrenia and sensitive to perinatal insults. We hypothesized that *PLAUR* polymorphisms influence negative symptoms and interact with early-life risk factors.

We examined 552 schizophrenia-spectrum patients (64.7% women, mean age 35.7 ± 12.8 years, illness duration 11.6 ± 10.3 years). Inclusion criteria: ICD-10 F20.x/F25.x, age ≥ 16 , European ancestry, PANSS data. PANSS scores were used to quantify symptom domains. Premature birth and birth complications were identified from medical records.

Genotyping of *PLAUR* SNPs (rs4760, rs344781, rs344779) was based on Illumina GSA v3 array data, processed in PLINK. Statistical analyses used JASP v0.19.0. Hardy–Weinberg equilibrium was tested via χ^2 . ANCOVA assessed SNP and environmental effects on PANSS domains, with sex and illness duration as covariates; Tukey’s HSD was used for post-hoc comparisons.

SNP rs4760 was associated with total negative symptoms ($p = 0.002$), AA ($p = 0.005$), and DE ($p = 0.002$). AA genotype carriers had lower scores than G+ (Mean Diff = -2.163 , $p = 0.002$). This remained significant only in patients without perinatal adversity. rs344781 showed a main effect on negative symptoms ($p = 0.016$) and interacted with prematurity (SA $p = 0.014$, DE $p = 0.009$); TT carriers born preterm had lower DE scores ($p = 0.048$). rs344779 was associated with positive ($p = 0.016$) and general symptoms ($p = 0.026$), and showed a trend-level interaction with prematurity in the SA domain ($p = 0.041$).

Our results highlight the contribution of *PLAUR* polymorphisms, especially rs4760 and rs344781, to negative symptom dimensions in schizophrenia, potentially mediated by neuroinflammation and gene–environment interactions.

Funding: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-technical programme for genetic technologies development for 2019–2030, agreement No. 075-15-2025-474 of 29.05.2025).

Mitochondrial genome manipulation using a programmable pAgo nuclease

B.A. Rinskaya^{1, 2, 4*}, E.V. Kropocheva^{2, 3}, E.I. Shchukina², A.V. Kulbachinskiy³, I.O. Mazunin^{2, 4}

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia*

² *Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

³ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

⁴ *Department of Biology and Genetics, Petrovsky Medical University, Moscow, Russia*

* *B.Rinskaya@skoltech.ru*

Key words: mitochondria; D-loop; prokaryotic argonaute proteins; mtDNA copy number

Efficient editing of the mitochondrial genome holds great promise for treating rare inherited diseases. However, current enzymatic tools are limited by the impermeability of mitochondrial membranes [1]. In this study, we introduce an alternative strategy based on prokaryotic Argonaute (pAgo) proteins, which offer key advantages over CRISPR-Cas nucleases, including smaller size, PAM-independent targeting, and the ability to use either RNA or ssDNA guides [2].

We report, for the first time, that a programmable pAgo fused to a mitochondrial targeting sequence (MTS) can be efficiently imported into human mitochondria, as demonstrated by immunocytochemical analysis. To assess whether pAgo remains functionally active after mitochondrial import, we performed a proof-of-concept experiment targeting the mitochondrial control region – specifically, the D-loop and R-loop structures – which play a central role in regulating mtDNA replication. Upon transfection with short synthetic guide RNAs designed to hybridise to these single-stranded regions, we observed a reproducible ~3-fold reduction in mtDNA copy number in HEK293T cells, as quantified by qPCR. Importantly, catalytically inactive pAgo mutants and pAgo variants lacking the mitochondrial targeting sequence did not affect mtDNA levels, indicating that both mitochondrial localisation and nuclease activity are required for the observed effect.

While further optimisation is required, these findings demonstrate the potential of programmable Argonaute systems for targeted manipulation of mitochondrial DNA and lay the groundwork for future development of compact, PAM-independent genome editing tools suited for mitochondrial applications.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation, No. 25-24-00078.

References

1. Rinskaya B., Shebanov N., Entelis N., Mazunin I. Enzymatic tools for mitochondrial genome manipulation. *Biochimie*. 2025;229:114-128. doi 10.1016/j.biochi.2024.10.013
2. Li Y., Liao D., Kou J. et al. Comparison of CRISPR/Cas and Argonaute for nucleic acid tests. *Trends Biotechnol.* 2023;41(5):595-599. doi 10.1016/j.tibtech.2022.11.002

Научное издание

CRISPR-2025

3-й международный конгресс

Тезисы докладов

Публикуется в авторской редакции

CRISPR-2025

3rd International Congress

Abstracts

Printed without editing

Выпуск подготовлен информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН

Подписано к печати 01.10.2025. Сетевое издание

Федеральный исследовательский центр
«Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10

