



**ШКОЛА  
МОЛОДОГО  
УЧЕНОГО РНФ**

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ:  
РЕГУЛЯЦИЯ ОБНОВЛЕНИЯ  
И РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА**



**Российский  
научный  
фонд**



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**



**ОБЩЕСТВО  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ  
МЕДИЦИНЫ**



Российский  
научный  
фонд



МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА



ОБЩЕСТВО  
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ  
МЕДИЦИНЫ

## ШКОЛА МОЛОДОГО УЧЕНОГО РНФ

Грант РНФ 19-75-30007

### «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека»

Современная концепция регенеративной медицины подразумевает исследование стволовых, прогениторных и специализированных клеток, внеклеточных компонентов и регуляторных сигналов, определяющих обновление тканей в норме, а также баланс между репаративными и регенеративными процессами при повреждении и поиск новых подходов к контролю за этими процессами.

Наш проект посвящен изучению механизмов межклеточной коммуникации и молекулярных сигналов разной природы, опосредующих взаимодействие стволовых клеток с их микроокружением, регуляцию дифференцировки и трансдифференцировки, перестройку внеклеточного матрикса и развитие фиброза. Этим определяется как актуальность, так и научная значимость исследования.

Результаты проекта, позволят создать новые способы воздействия на процессы обновления и репарации тканей.





Руководитель гранта:  
академик  
**Ткачук  
Всеволод  
Арсеньевич,**  
Декан факультета  
фундаментальной  
медицины МГУ  
имени М.В. Ломоносова

**Регенеративная медицина** – современная область медицинской науки, ставящая своей целью выращивание утраченных или не сформировавшихся органов и тканей человека



## ПРОГРАММА

<b>Роль стромальных клеток в регенерации тканей</b> <i>Председатели –</i> <i>Макаревич Павел Игоревич, Калинина Наталья Игоревна</i>	
<b>11:30-11:45</b>	<b>Вступительное слово руководителя проекта</b> Ткачук Всеволод Арсеньевич, МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>11.45-11.55</b>	<b>Выступление от РНФ</b>
<b>11.55-12.05</b>	<b>Выступление от индустриального партнера</b> Самсонов Михаил Юрьевич, директор медицинского департамента, группа компаний «Р-Фарм»
<b>12:05-12:20</b>	<b>Механизмы участия мультипотентных стромальных клеток в регуляции обновления и регенерации тканей</b> Калинина Наталья Игоревна, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>12:20-12:35</b>	<b>Гетерологическая сенситизация альфа-1А-адренорецепторов как механизм выбора дифференцировочной судьбы мезенхимных стромальных клеток</b> Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>12:35-12:50</b>	<b>Notch-зависимые механизмы остеогенной дифференцировки клеток</b> Малашичева Анна Борисовна, Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России
<b>12:50-13:05</b>	<b>Внеклеточный матрикс мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: особенности продукции и регуляции при «физиологической» гипоксии</b> Андреева Елена Ромуальдовна, Институт медико-биологических проблем РАН
<b>13:05-13:20</b>	<b>Терапевтическая эффективность и биораспределение мезенхимных стромальных клеток и нейтральных прогениторных клеток, полученных из разных источников, после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга</b> Наместникова Дарья Дмитриевна, РНИМУ имени Н.И. Пирогова

## ПРОГРАММА

<b>Генное редактирование для регенеративной медицины</b> <i>Председатели – Закиян Сурен Минасович, Парфенова Елена Викторовна, Воронцова Мария Владимировна</i>	
<b>14:00-14:20</b>	<b>Создание трансгенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предназначенных для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона и тестирования перспективных лекарственных соединений</b> Медведев Сергей Петрович, Институт цитологии и генетики СО РАН
<b>14:20-14:40</b>	<b>Создание и тестирование генетической конструкции для CRISPR-опосредованного «выключения» регуляторных последовательностей генома, генов некодирующих РНК и генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм</b> Карагяур Максим Николаевич, Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>14:40-15:00</b>	<b>Improving CRISPR-Cas technology for therapeutic applications</b> Логвина Наталья Александровна, Сколковский институт науки и технологий
<b>15:00-15:15</b>	<b>Получение ИПСК от пациентов с муковисцидозом и редактирование мутации F508del в гене CFTR с помощью CRISPR/Cas9</b> Кондратьева Екатерина Владимировна, Медико-генетический научный центр
<b>15:15-15:30</b>	<b>Функциональная роль модификации РНК. Поиск и изучение функции новых РНК метилтрансфераз млекопитающих</b> Сергиев Петр Владимирович, Институт функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова



**Калинина**  
**Наталья Игоревна,**  
 к.б.н., в.н.с. факультета  
 фундаментальной медицины МГУ  
 имени М.В. Ломоносова,  
 Москва

### Механизмы участия МСК в регенерации тканей



Kalinina N, et al. Stem Cell Res Ther. 2015; 6:221.

Kalinina N, et al. Exp Cell Res. 2015; 339(1):61-6.

## **Механизмы участия мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в регуляции обновления и регенерации тканей**

Мультипотентные стромальные клетки (МСК) обеспечивают обновление стромы – поддерживающего компонента ткани, который формирует ее структуру и обеспечивает ее трофику. МСК не только участвуют в физиологическом обновлении ткани, но и в ее восстановлении после повреждения.

Основным механизмом участия МСК в восстановлении тканей оказалась не их способность к дифференцировке, а секреция широкого спектра биологически активных молекул. Несколькими коллективами, в том числе и нами, было показано, что МСК секретируют факторы, которые по механизму действия можно поделить на несколько кластеров: матриксные белки (формирующие структуру ткани), ангиогенные (восстановление трофики ткани), нейротрофные (интеграция восстановленной ткани в регуляторную сеть), иммуномодулирующие (регуляция воспаления и иммунного ответа), а также факторы, стимулирующие метаболизм клетки. Секреция этих факторов регулируется напряжением кислорода, гормонами, и факторами роста.

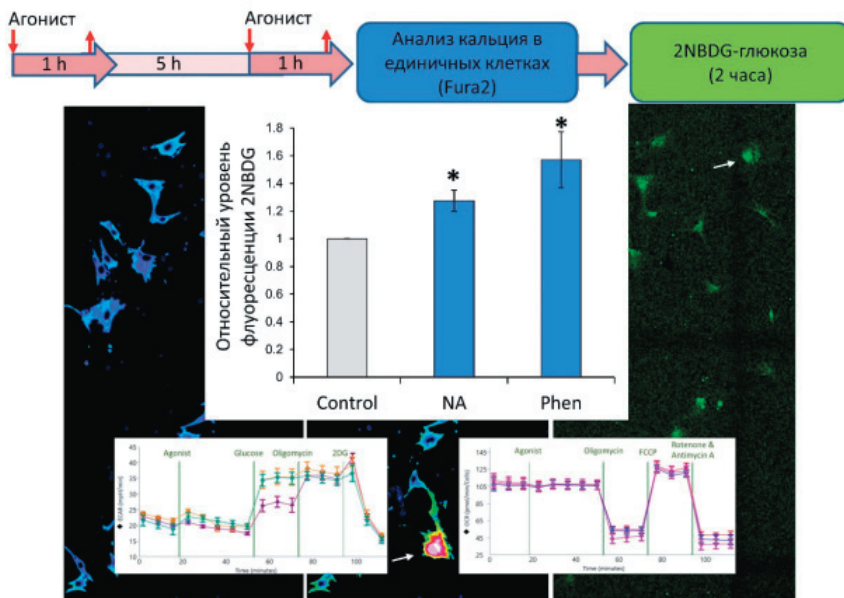
МСК способны изменять функциональную активность и даже фенотип окружающих клеток путем прямого переноса в них матричных и регуляторных РНК, а также мембранных рецепторов посредством продукции внеклеточных везикул, включая экзосомы и микровезикулы.

Исследование выполняется при поддержке РНФ (грант 19-75-30007).



**Тюрин-Кузьмин  
Петр Алексеевич,**  
к.б.н., доцент факультета  
фундаментальной медицины МГУ  
имени М.В. Ломоносова,  
Москва

В ответ на стимуляцию  $\alpha 1$ -адренорецепторов повышается вход глюкозы в МСК за счет изменения метаболизма



Tyurin-Kuzmin, P.A., et al., Scientific reports, 2016, 6, p.32835.

Kotova, P.D., et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2014 1843(9), pp.1899-1908.



## **Гетерологическая сенситизация альфа-1А-адренорецепторов как механизм выбора направления дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток**

Обновление жировой ткани и поддержание её метаболической активности обусловлено пролиферацией и дифференцировкой мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) в адипоциты, способные к адекватной продукции гормонов жировой ткани адипокинов.

Ранее мы обнаружили, что один из ключевых регуляторов активности МСК норадреналин, запускает в них уникальный для клеток взрослого организма процесс гетерологической сенситизации  $\alpha$ 1А-адренорецепторов, что приводит к переключению внутриклеточной сигнализации от цАМФ-зависимого сигнального каскада  $\beta$ -адренорецепторов на кальциевую сигнализацию, сопряженную с  $\alpha$ 1А-адренорецепторами. В результате такого переключения происходит подавление адипогенной дифференцировки МСК, переход клеток на полностью анаэробный метаболизм, а также возрастает их синтетическая активность. Анаэробный гликолиз является одной из важнейших характеристик стволовых клеток, а синтетическая активность МСК необходима для обновления и здорового разрастания жировой ткани.

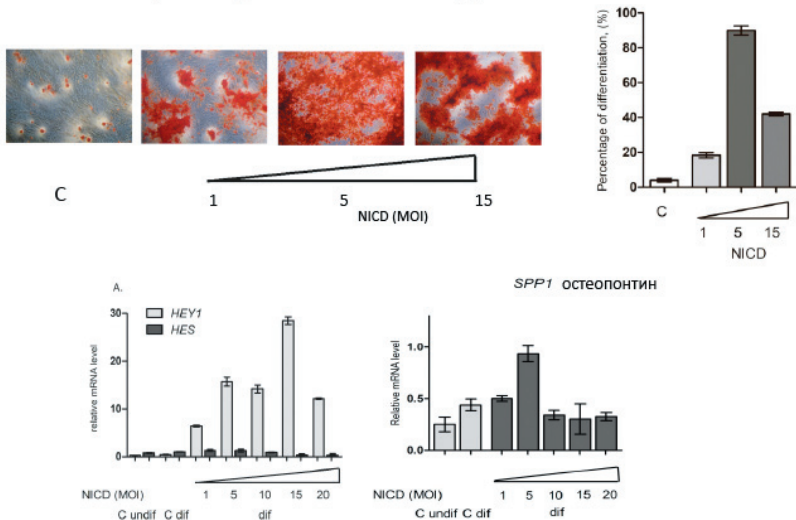
Таким образом, гетерологическая сенситизация  $\alpha$ 1А-адренорецепторов способствует переключению метаболизма МСК на анаэробный гликолиз и повышению их синтетической активности. Работа поддержана грантом РФФИ №19-75-30007.



**Малашичева  
Анна Борисовна,**  
к.б.н, в.н.с., зав. лаб.  
Регенеративной биомедицины  
ИНЦ РАН, зав. НИЛ Молекулярной  
кардиологии НМИЦ им. Алмазова,  
доцент каф. эмбриологии  
биологического факультета СПбГУ

### Доза Notch имеет критическое значение для остеогенной дифференцировки МСК

Дифференцировка МСК при дозо-зависимой активации Notch  
путём введения NICD на лентивирусном носителе



Aquila G...**Malaschicheva A.** 2019 The Notch pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases? *Expert Opin Ther Targets* 23:695-710.

Kostina A ...**Malashicheva A.** 2019 Human aortic endothelial cells have osteogenic Notch-dependent properties in co-culture with aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 514(2):462-468

## **Notch-зависимые механизмы остеогенной дифференцировки клеток**

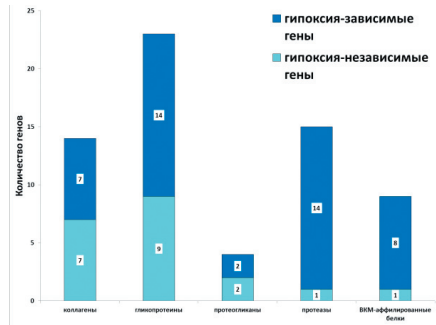
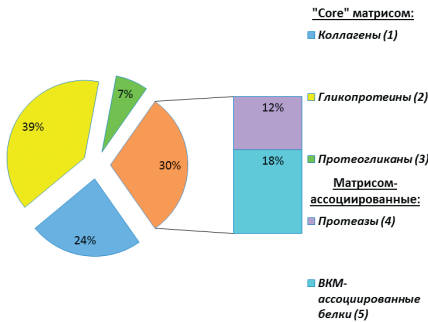
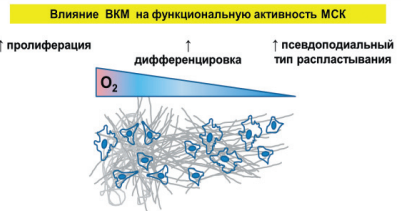
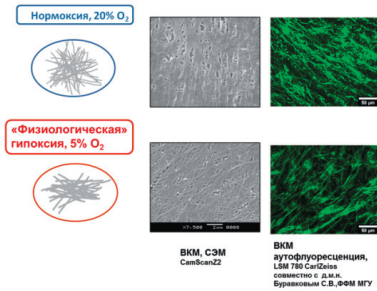
Остеогенная дифференцировка – многоступенчатый процесс, этапы которого протекают сходно при образовании костной ткани в норме и при кальцификации сосудов и клапанов сердца при патологии и старении. Гены и соответствующие белки, которые накапливаются на продвинутых стадиях остеогенной дифференцировки, относятся к семействам WNT, BMP и RUNX. Факторы активации генов и клеточных сигнальных путей на ранних этапах остеогенной дифференцировки остаются слабо изученными. Расшифровка ранних механизмов запуска остеогенной дифференцировки важна с точки зрения возможности управления этой дифференцировкой – для индукции остеогенеза, когда необходимо образование костной ткани, либо для предотвращения при различных патологиях, связанных с кальцификацией тканей. Целью нашей работы является поиск ранних инициаторных механизмов остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, приводящих к патологической кальцификации тканей сердца. В работе использован спектр клеток мезенхимного происхождения: мезенхимные клетки жировой ткани человека, мезенхимные клетки сердца человека и крысы, интерстициальные клетки аортального клапана, гладкомышечные клетки аорты. Исследована роль сигнального пути Notch в активации остеогенных путей дифференцировки клеток и соответствующих генов. Сделаны выводы о роли компонентов сигнального пути Notch в остеогенной дифференцировке.

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-29-04082.



**Андреева  
Елена Ромуальдовна,**  
д.б.н., в.н.с. лаборатории  
клеточной физиологии ГНЦ РФ –  
ИМБП РАН,  
Москва

**Децеллюляризованный ВКМ от МСК при различном уровне O<sub>2</sub>**



Buravkova et al. *Mitochondrion*. 2014 ;19 Pt A:105-12.

Андреева, Матвеева. *Физиология человека*. 2018 ; 44(6):104-114.

## **Внеклеточный матрикс мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: особенности продукции и регуляции при «физиологической» гипоксии**

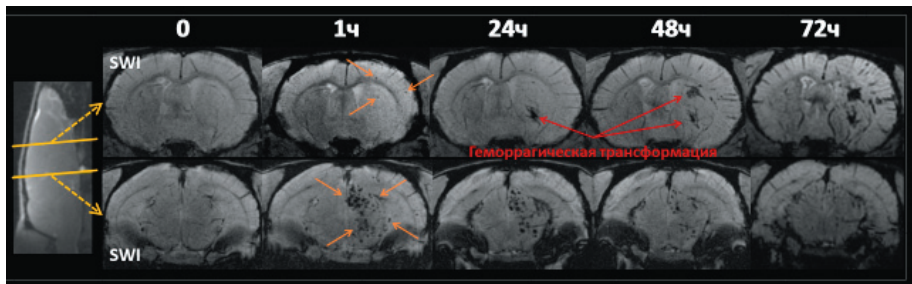
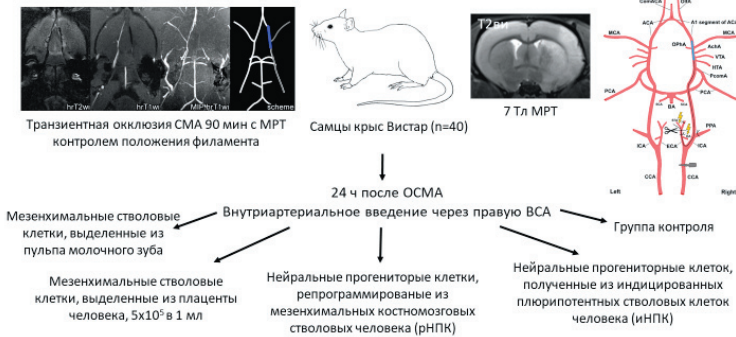
Факторы клеточного микроокружения, такие как низкий уровень  $O_2$ , играют важную роль в модификации клеток, в том числе и в метаболизме внеклеточного матрикса (ВКМ). Сравнительный анализ показал, что МСК, постоянно культивируемые в условиях «физиологической» гипоксии (5%  $O_2$ ) и при нормоксии (20%  $O_2$ ), продуцируют хорошо развитый ВКМ, практически не различающийся по содержанию коллагеновых и неколлагеновых компонентов. Полногеномный скрининг дифференциальной экспрессии матрикс-ассоциированных генов в МСК при 5 и 20%  $O_2$  выявил изменения в транскрипции ряда генов, кодирующих белки основного («core») матрикса: коллагеновых белков, гликопротеинов, протеогликанов, и матрикс-ассоциированных белков: протеаз и ВКМ-ассоциированных молекул. Согласно базе Nuroxia DB для более чем половина генов «core» матрикса и почти все матрикс-ассоциированные гены верифицированы как гипоксия-зависимые.

Сдвиг профиля транскрипции ВКМ-ассоциированных молекул: снижение активности генов, ответственных за продукцию матрикса, повышение активности генов ферментов, его деградирующих; снижение экспрессии генов интегринов, которые «заякоривают» клетки к матриксу, дает основание предположить, что в случае повреждения МСК окажутся более «подготовленными» к реализации репаративных свойств, таких как миграция и пролиферация. Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН № 19.



**Наместникова  
Дарья Дмитриевна,**  
врач невролог, ассистент кафедры  
неврологии, нейрохирургии и  
медицинской генетики РНИМУ  
им. Н.И. Пирогова

Терапевтическая эффективность и биораспределение различных типов стволовых клеток после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга



Namestnikova D, Gubskiy I et al. Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain. PLoS ONE (2017) 12(10): e0186717.

L. Gubskiy, D. D. Namestnikova, E. A. Cherkashova, et al. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling. Translational Stroke Research. August 2018, Volume 9, Issue 4, pp 417–425.

D Namestnikova, I Gubskiy et al. MRI evaluation of frequent complications after intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells in rats. IOP Journal of Physics: Conference Series, Volume 886, conference 1 (2017) 012012.

## **Терапевтическая эффективность и биораспределение мезенхимальных стромальных клеток и нейральных прогениторных клеток, полученных из разных источников, после внутриартериальной трансплантации крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга**

В нашей работе был проведен сравнительный анализ биораспределения и эффективности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и нейральных прогениторных клеток (НПК), полученных из разных источников, после внутриартериального введения крысам с моделью острой фокальной ишемии мозга.

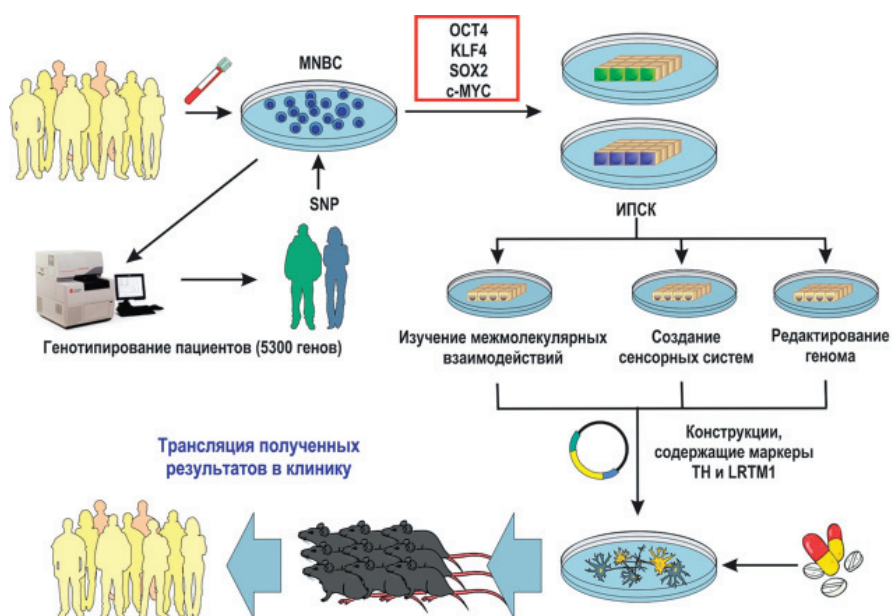
Самцам крыс линии Вистар была произведена транзиторная окклюзия средней мозговой артерии 90 мин, после чего через 24ч в ипсилатеральную внутреннюю сонную артерию при помощи инфузомата со скоростью 100 мкл/мин с поддержанием кровотока вокруг катетера вводили 1 мл физиологического раствора или различные типы СК человека ( $5 \times 10^5$  в 1 мл): МСК, выделенные из плаценты (пМСК) или дентальной пульпы молочных зубов (дМСК), нейральные прогениторные клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных клеток (иНПК) или полученные методом прямого репрограммирования из МСК костного мозга с помощью транскрипционных факторов *MSI1*, *NGN2*, *MBD2* (рНПК, drNPC).

Трансплантация всех изученных типов СК уже на 7 сутки после введения вызывала статистически достоверное более быстрое функциональное восстановления после инсульта экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой. Однако трансплантация только иНПК и рНПК ускоряла уменьшения очага инфаркта мозга. После внутриартериального введения все типы трансплантированных СК распределялись в полушарии введения преимущественно по периферии очага инфаркта, а также в области ствола мозга. Наши результаты указывают на различный характер хоуминга и потенциальных механизмов терапевтического действия разных типов стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184).



**Медведев  
Сергей Петрович,**  
к.б.н., старший научный  
сотрудник ФГБНУ  
«Федеральный  
исследовательский центр  
Институт цитологии  
и генетики СО РАН»  
г. Новосибирск



Устьянцева Е.И., Медведев С.П., Ветчинова А.С., Минина Ю.М., Иллариошкин С.Н., Закиян С.М. Платформа для исследования механизмов нейродегенерации с помощью генетически кодируемых биосенсоров // Биохимия. 2019. Т. 84(3). С. 423-435.



## **Создание трансгенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предназначенных для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона и тестирования перспективных лекарственных соединений**

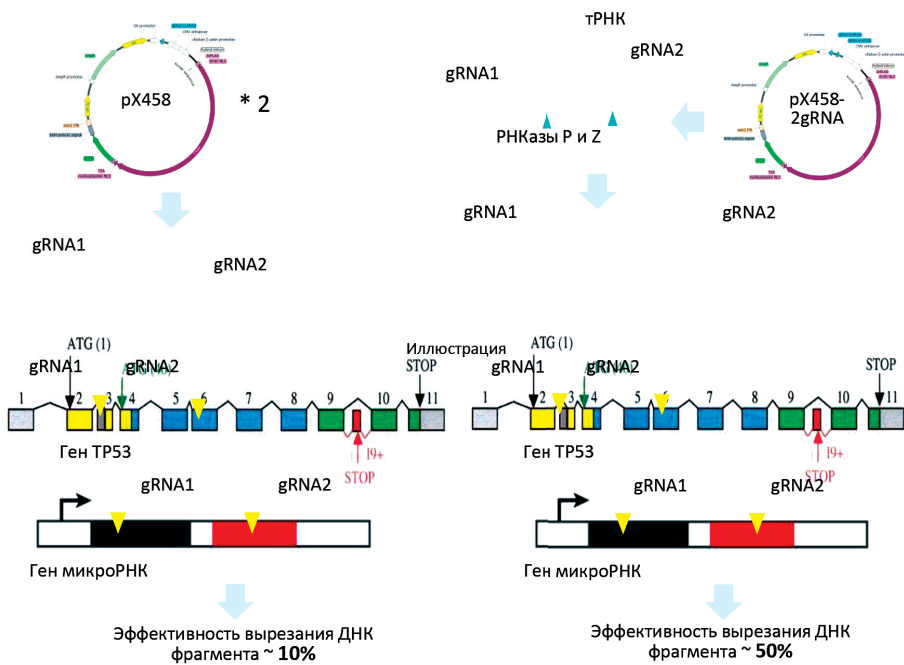
Одними из патологических проявлений болезни Паркинсона (БП) на клеточном уровне являются повышенная продукция и чувствительность к активным формам кислорода, а также формирование цитотоксичных (олигомерных) форм белка  $\alpha$ -синуклеин.

Нами получены и охарактеризованы линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента, имеющего полиморфизм с.C1256T в гене LRRK2. На основе данных линий, с применением CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе AAVS1, были созданы трансгенные клоны, несущие доксициклин-управляемый трансген биосенсора окислительно-восстановительного потенциала глутатиона – Cyto-Grx1-roGFP2 или трансген  $\alpha$ -синуклеина (SNCA), имеющий на С-конце эпитопы 3 $\times$ FLAG и 2 $\times$ Strep-Tag II, предназначенные для тандемной аффинной очистки белковых комплексов. В полученных клонах, прошедших дифференцировку в сторону дофаминергических нейронов, была подтверждена активность биосенсора Cyto-Grx1-roGFP2, а также подтверждена управляемая экспрессия трансгена SNCA. Показано, что наличие эпитопов 3 $\times$ FLAG и 2 $\times$ Strep-Tag II не мешает формированию димерных форм  $\alpha$ -синуклеина.

В результате нами создана клеточная платформа для исследования редокс-потенциала глутатиона и изучения интерактома  $\alpha$ -синуклеина в релевантных типах клеток пациента, страдающего болезнью Паркинсона.



**Карагяур  
Максим Николаевич.,**  
к.б.н, с.н.с. Института  
регенеративной медицины  
МНОЦ МГУ  
имени М.В. Ломоносова



Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. (2015) Proc. Natl. Acad. Sci., 112, 3570–3575  
Karagyaur MN et al. (2018) Biochemistry (Moscow), 83(6):629–642

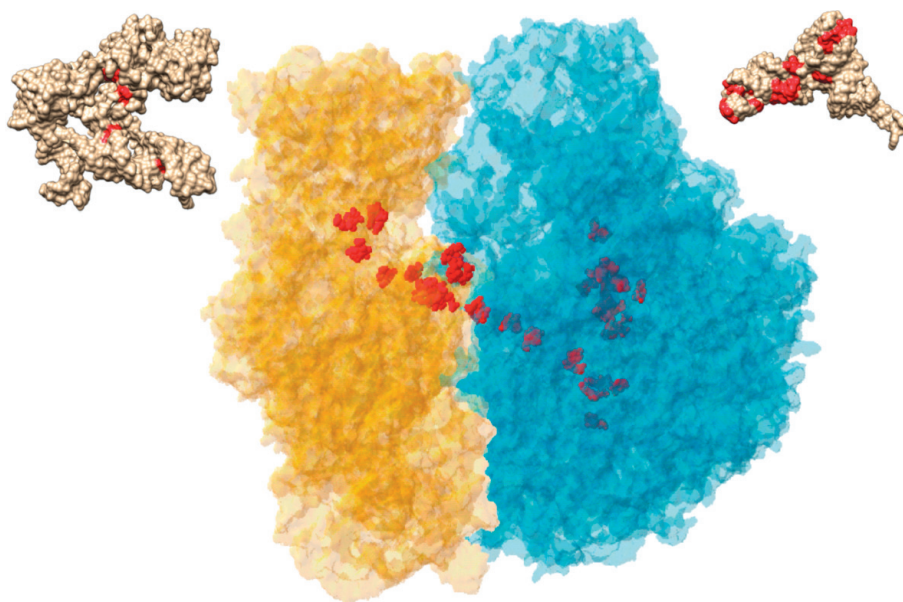
## **Создание и тестирование генетической конструкции для CRISPR-опосредованного «выключения» регуляторных последовательностей генома, генов некодирующих РНК и генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм**

Технологии редактирования генома позволяют изучать роль отдельных генов и функциональных элементов генома в реализации физиологических свойств и развитии патологических состояний клетки. Одним из наиболее удобных подходов для решения таких задач является «выключение» целевых генов. В большинстве случаев этого можно достичь использованием нуклеазы Cas9 в комплексе с одной единственной направляющей РНК (gRNA). Однако «выключение» регуляторных областей генома, генов некодирующих РНК (например, одной или нескольких микроРНК) и генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм, т.е. вырезание определенного фрагмента целевой ДНК, представляет собой существенную проблему. По данным литературы одной из возможных схем одновременной экспрессии двух gRNA в одной генетической конструкции является объединение обеих gRNA, разделенных tРНК, под контроль одного промотора. В таких системах транскрибируемая гибридная РНК расщепляется эндогенными эукариотическими РНКазами Р и Z на отдельные gRNA и tРНК. Данная схема экспрессии gRNA реализована и в данной работе. Собранный генетический конструкт рХ458-2g кодирует остовы gRNA, разделенные tРНК (*Mus\_musculus\_tRNA-Gly-GCC-2-4*). Встраивание спейсеров gRNA осуществляется по сайтам эндонуклеаз рестрикции BbsI и BsaI. В ходе работы будет изучена эффективность применения полученной генетической конструкции для вырезания генов микроРНК и «выключения» генов белков, характеризующихся многообразием сплайс-форм.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04172.



**Сергиев**  
**Петр Владимирович,**  
профессор РАН, профессор  
Химического факультета,  
директор Института  
функциональной геномики МГУ  
имени М.В.Ломоносова



Sergiev P.V., Golovina A.Y., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Sergeeva O.V., Chugunova A.A., Evfratov S.A., Andreianova E.S., Pletnev P.I., Laptev I.G., Petriukov K.S., Navalayeu T.I., Koteliansky V.E., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. // N6-Methylated Adenosine in RNA: From Bacteria to Humans. - J Mol Biol. - 2016 – v. 428. – p. 2134-2145.

Sergiev P.V., Aleksashin N.A., Chugunova A.A., Polikanov Y.S., Dontsova O.A. Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation.// Nat Chem Biol. - 2018 – v. 14. p.226-235.

## **Функциональная роль модификации РНК. Поиск и изучение функции новых РНК метилтрансфераз млекопитающих**

Во всех организмах множество функциональных молекул РНК модифицированы с помощью специализированных ферментов. У млекопитающих модификации подвергаются транспортные, рибосомные, матричные РНК, а также многочисленная группа малых РНК. В докладе будут рассмотрены данные научной литературы о модификации мРНК, механизмах распознавания и «стирания» модифицированных нуклеотидов. Также будут рассмотрены собственные результаты нашей научной группы о поиске новых митохондриальных РНК метилтрансфераз, их эволюции и функциональной роли. Кроме этого, будет обсуждение последних, пока не опубликованных результатов нашей работы, связанных с исследованием функции предположительных РНК метилтрансфераз млекопитающих с тканеспецифичной экспрессией. Буде проиллюстрирована возможность применения методов геномного редактирования на модели клеточных линий и мышей для изучения функциональной роли генов, участвующих в эпигенетическом регулировании.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00043.



**Кондратьева  
Екатерина Владимировна,**  
научный сотрудник  
лаборатории  
редактирования  
генома,  
МГНЦ, Москва

Схема локуса гена *CFTR* с мутацией F508del, используемых sgRNA и ssODN



- Последовательность PAM для Cas9
- Последовательность sgRNA (единой направляющей РНК)
- Последовательность ssODN (одноцепочечных олигонуклеотидов)

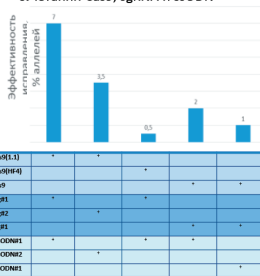
ИПСК  
(индуцированные  
плюрипотентные  
стволовые клетки)

Эксперименты



**Результаты**

Средняя эффективность исправления мутации p.F508del в гене *CFTR* в ИПСК путем гомологичной репарации при использовании различных сочетаний Cas9, sgRNA и ssODN



Кондратьева Е.В., Адильгереева Э.П., Амелина Е.Л., Табаков В.Ю., Анучина А.А., Устинов К.Д., Ясиновский М.И., Воронина Е.С., Лавров А.В., Смирнихина С.А. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов пациента с муковисцидозом. Сибирское медицинское обозрение. 2019;(2):95-101

Kondratyeva E. V., Anuchina A. A., Adilgereeva E. P., Amelina E. L., Ustinov K. D., Yasinovsky M. I., Kochergin-Nikitsky K. S., Zainitdinova M. I., Mozgovoy I. V., Lavrov A. V., Smirnikhina S. A. E. P16.02 - F508del editing in patient-derived iPSCs by CRISPR/Cas9. ESHG 2019.

## Получение ИПСК от пациентов с муковисцидозом и редактирование мутации F508del в гене CFTR с помощью CRISPR/Cas9

Муковисцидоз (МВ) – заболевание, обусловленное мутациями в гене CFTR, самой частой из них является p.F508del. В свете развивающихся генно-клеточных подходов к лечению заболеваний целью работы стало получение ИПСК из фибробластов больных МВ и редактирование в них мутации p.F508del с помощью CRISPR/Cas9.

Репрограммирование фибробластов осуществляли с помощью вируса Сендай с факторами Яманака. Для редактирования мутации использовали ряд нуклеаз в комбинации с различными sgRNA, для репарации двуцепочечных разрывов разработали серию ssODN. Анализ образованных инделов и вставок СТТ (исправление мутации) оценивали с помощью NGS.

В результате получены и охарактеризованы линии ИПСК от трех пациентов. На одной линии проведены эксперименты по редактированию мутации. С учетом эффективности трансфекции частота внесения инделов составила от 102 до 133% аллелей. Наибольшую эффективность исправления мутации (т.е. вставки СТТ) отмечали при использовании комбинации SpCas9(1.1)/sgCFTR#1 с ssODN#1 (7% аллелей).

Редактирование генома ИПСК в сочетании с их дальнейшей сортировкой, культивированием и дифференцировкой можно использовать для разработки лечения пациентов с использованием их собственных клеток.

