

Научная статья

УДК 575.162

doi: 10.17223/19988591/69/13

Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека как инструмент функционального анализа генетических вариантов

Сергей Петрович Медведев¹, Валерия Игоревна Ахмерова²,
Юлия Андреевна Надточий³, Елена Викторовна Григорьева⁴,
Софья Викторовна Павлова⁵, Сурен Минасович Закиян⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

^{1, 4, 5, 6} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

^{2, 3} Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

² v.akhmerova@g.nsu.ru

³ y.nadtochii@g.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlena@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Аннотация. Развитие высокопроизводительных методов геномики привело к появлению огромных массивов информации и обширных баз данных о полиморфизмах или генетических вариантах, встречающихся в геномах пациентов с заболеваниями различных органов и систем. Однако лишь для небольшой доли генетических вариантов подтвержден патологический статус и проведены подробные исследования молекулярно-генетических механизмов, вызванных ими патологических процессов, что требует создания новых модельных систем. Нами был исследован потенциал применения программируемой нуклеазы AsCas12a для внесения двуцепочечных разрывов ДНК в локусах, ассоциированных с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями человека (*MYBPC3*, *APOE*, *PSEN1*, *LRRK2*, *PINK1* и *PRKN*), а также для внесения трансгена EGFP в локус *SOX6* генома индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового человека. Кроме того, с помощью CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе *AAVS1* были получены ИПСК здорового донора и пациента с генетическим вариантом с.2013T>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*, которые несут доксициклин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer. В результате было установлено, что нуклеаза AsCas12a может применяться для нокаута генов и стимуляции гомологичной рекомбинации в геномах ИПСК человека, а также получена модель для исследования биогенеза митохондрий в клетках с патогенным полиморфизмом в гене *MAPT*, ассоциированном с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточные модели, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17, редактирование геномов, AsCas12a, SpCas9

Источник финансирования: исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Для цитирования: Медведев С.П., Ахмерова В.И., Надточий Ю.А., Григорьева Е.В., Павлова С.В., Закиан С.М. Направленное редактирование геномов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека как инструмент функционального анализа генетических вариантов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 113–121. doi: 10.17223/19988591/69/13

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/13

Targeted editing of human induced pluripotent stem cells genomes as a tool for functional analysis of genetic variants

Sergey P. Medvedev¹, Valeria I. Akhmerova², Julia A. Nadtochy³,
Elena V. Grigor'eva⁴, Sofia V. Pavlova⁵, Suren M. Zakian⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

^{1, 4, 5, 6} Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

^{2, 3} Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

² v.akhmerova@g.nsu.ru

³ y.nadtochii@g.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlana@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Summary. The creation of models that are designed to study the molecular genetic mechanisms of disease development, search for target molecules and test potential drugs and technologies is one of the current areas of modern biomedicine. An alternative to the use of animal models is cellular models, in particular those based on the use of differentiated derivatives of induced pluripotent stem cells. Genome editing tools, for example, CRISPR-mediated systems, make it possible to artificially create various genetic variants (single nucleotide polymorphisms, deletions, insertions, etc.), and can also be used to stimulate homologous recombination during targeted transgenesis. The combination of these systems with the technology of induced pluripotent stem cells makes them a unique tool for creating models of human hereditary pathologies. In this work, we used clones of human induced pluripotent stem cells of the ICGi022-A line (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A>), which carry transgenes of two variants of the AsCas12a nuclease that recognize different PAM consensus sequences (ICGi022-A-6 (As-Cas12a, PAM 5'-TTTV-3') and ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3')), and the reverse doxycycline-dependent transactivator transgene M2rtTA. The work also used induced pluripotent stem cells from a healthy donor and a patient with the genetic variant c.2013T > G (rs63750756, p.N279K) in the *MAPT* gene. All lines of induced pluripotent stem cells were obtained by the authors previously. Protospacers for AsCas12a were selected using the Benchling platform (<https://www.benchling.com/>). The selection took into account potential off-target activity and proximity to the point of interest in the genome. Constructs for expression of AsCas12a gRNA were created based on the pTE4560 vector (Addgene #107526). T7EI analysis was used to study the efficiency of AsCas12a. Gibson's method was used to assemble the pSOX6-T2A-EGFP-HygroR plasmid construct. To obtain clones of cells with the MitoTimer transgene, pX458-AAVS1 and pAAVS1-TRE-mCMV-MitoTimer constructs created by molecular cloning were used. The donor plasmid AAVS1-Neo-M2rtTA, encoding the reverse tetracycline transactivator, was obtained from the Addgene depository (Addgene #60843). PCR was used to analyze transgenic cell clones. The creation of isogenic cell models,

including knockout cell lines and lines carrying various genetic variants (single nucleotide polymorphisms, deletions and insertions), as well as transgenic cell lines, is an urgent biomedical task. Our study shows that the programmable nuclease AsCas12a (PAM consensus - 5'-TTTV-3') introduces double-stranded DNA breaks in the loci of the genomes of human induced pluripotent stem cells, which are associated with neurodegenerative and cardiovascular diseases (*MYBPC3* - efficiency (T7EI) $16.2 \pm 1.42\%$ and $13.4 \pm 0.91\%$, *APOE* - $25.3 \pm 1.76\%$, *LRRK2* - $23.5 \pm 1.86\%$ and $11.4 \pm 0.04\%$, *PRKN* - $20.6 \pm 0.63\%$ and $9.6 \pm 0.01\%$, *PSEN1* - $3.3 \pm 0.01\%$ and $4.2 \pm 0.01\%$, *PINK1* - $8.0 \pm 0.02\%$), which makes it a promising tool for knocking out genes and stimulating the process of homologous recombination in this type of cell. In this case, induced pluripotent stem cell lines carrying the doxycycline-driven transgene for the programmable nuclease AsCas12a can be used to create isogenic cellular models of pathological processes. In addition, it was established that in the line of human induced pluripotent stem cells carrying the AsCas12a transgene (PAM consensus - 5'-TYCV-3'), successful As-Cas12a-mediated homologous recombination of the 3' region of the *SOX6* gene occurs with the plasmid donor construct, which is intended to mark the expression of the SOX6 transcription factor using the fluorescent protein EGFP, which shows the promise of using this cell line to create transgenic human induced pluripotent stem cells. By CRISPR/SpCas9-mediated homologous recombination at the *AAVS1* locus, three clones of induced pluripotent stem cells from a healthy donor and four clones of induced pluripotent stem cells from a patient with the genetic variant c.2013T > G (rs63750756, p.N279K) in the *MAPT* gene, which carry doxycycline, were obtained -transgene-driven biosensor MitoTimer. It was confirmed that the resulting transgenic clones of induced pluripotent stem cells express markers of self-renewal and pluripotency of human cells, have a normal karyotype and can be differentiated into derivatives of the three primitive germ layers - ectoderm, mesoderm, endoderm. Thus, the combined use of induced pluripotent stem cell technology and programmable nucleases AsCas12a and SpCas9 makes it possible to create a wide range of cellular models, including pluripotent cell lines with knockout of genes associated with hereditary human diseases, and transgenic lines designed for live-cell visualization of cellular processes.

The article contains 8 References.

Keywords: induced pluripotent stem cells, cell models, Parkinson's disease, frontotemporal dementia with parkinsonism-17, genome editing, AsCas12a, SpCas9

Fundings: The reported study was funded by Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra according to research project № 2023-573-05.

For citation: Medvedev SP, Akhmerova VI, Nadtochy JA, Grigor'eva EV, Pavlova SV, Zakian SM. Targeted editing of human induced pluripotent stem cells genomes as a tool for functional analysis of genetic variants. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2025;69:113-121. doi: 10.17223/19988591/69/13

Введение

Создание моделей, которые предназначены для изучения молекулярно-генетических механизмов развития болезней, поиска молекул-мишеней и тестирования потенциальных лекарственных препаратов и технологий, является одним из актуальных направлений современной биомедицины. В настоящий момент подавляющее большинство фундаментальных и прикладных фармацевтических исследований осуществляется с применением грызунов (мышей и крыс) в качестве модельных организмов. Однако суще-

ствуют примеры, когда животные модели не способны в полной мере отразить проявления болезни на молекулярном и клеточном уровнях. Например, существуют значительные проблемы при создании животных моделей нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Альтернативой использованию животных моделей являются клеточные модели, в частности, основанные на применении дифференцированных производных ИПСК. ИПСК могут быть направленно дифференцированы в практически любой тип клеток, они способны к самообновлению, что решает проблему получения труднодоступных типов клеток, например нейронов или кардиомиоцитов.

Создание клеточных модельных систем требует применения инструментов редактирования геномов, которые обладают двумя свойствами – высокой точностью и эффективностью работы в используемом типе клеток. В нашей работе мы исследовали возможность применения программируемой нуклеазы AsCas12a для редактирования геномов ИПСК человека. Существуют экспериментальные доказательства того, что данный фермент работает более специфично по сравнению с наиболее часто применяемой нуклеазой SpCas9 [1]. Его можно использовать для мультиплексного редактирования генов, так как он способен к процессированию направляющей РНК [2]. Однако AsCas12a обладает сравнительно низкой активностью и не может вносить разрыв в некоторые участки генома, что связывают с большей плотностью нуклеосом в этих районах [3].

Исследование моделей на основе ИПСК требует применения методических подходов, которые бы позволили исследовать физиологические и биохимические параметры на живых клетках в режиме реального времени. Одним из таких подходов является использование генетически кодируемых биосенсоров. В данной работе мы применили систему CRISPR/SpCas9 для создания ИПСК пациента с вариантом с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT* и здорового донора, несущих доксициклин-управляемый трансен биосенсора MitoTimer [4]. Данный генетический вариант в гене *MAPT* ассоциирован с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17. Это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся патологической агрегацией белка тау с образованием нейрофибриллярных клубков и дальнейшей гибелью нейронов. Белок тау, кодируемый геном *MAPT*, регулирует сборку и стабилизацию микротрубочек, участвуя в передаче сигнала в ЦНС и аксональном транспорте. Генетический вариант с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT* приводит к нарушению взаимодействия белка тау с микротрубочками, образованию нитевидных включений и последующей гибели нейронов, что приводит к развитию лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17 [5]. Точный механизм развития болезни при этом генетическом варианте пока не известен, что не позволяет выработать схему лечения. Использование биосенсорных систем, в частности, биосенсора MitoTimer, может способствовать более глубокому пониманию патологических процессов, происходящих в живых клетках.

Цель работы – исследование спектра и эффективности применения программируемых нуклеаз AsCas12a и SpCas9 для направленного редактирования геномов ИПСК человека при создании клеточных моделей заболеваний человека.

Материалы и методы

В данной работе мы использовали клоны индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека линии ICGi022-A (<https://hpscreg.eu/cell-line/ICGi022-A>), которые несут трансгены двух вариантов нуклеазы AsCas12a, распознающих разные консенсусы PAM (ICGi022-A-6 (AsCas12a, PAM 5'-TTTV-3') и ICGi022-A-7 (AsCas12a, PAM 5'-TYCV-3')), и трансген обратного доксициклин-зависимого транскриптора M2rtTA [6]. Также в работе были использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки здорового донора и пациента с генетическим вариантом с.2013T > G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*. Все линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток получены авторами ранее. Протоспейсеры для AsCas12a выбирали с помощью Web-платформы Benchling (<https://www.benchling.com/>). Конструкции для экспрессии нРНК AsCas12a создавали на основе вектора pTE4560 (Addgene #107526). Для исследования эффективности работы AsCas12a использовали T7E1-анализ. Для сборки плазмидной конструкции pSOX6-T2A-EGFP-HygroR применяли метод Гибсона. Для получения клонов клеток с трансгеном MitoTimer были использованы конструкции pX458-AAVS1 и pAAVS1-TRE-mCMV-MitoTimer, созданные методом молекулярного клонирования. Донорная плаزمида AAVS1-Neo-M2rtTA, кодирующая обратный тетрациклиновый транскриптор, была получена из депозитария Addgene (Addgene #60843). Для доставки конструкций в клетки применяли липофекцию (Lipofectamine3000 Transfection Reagent, «Thermo Fisher Scientific», США) или электропорацию (Neon Transfection System, «Thermo Fisher Scientific», США) с последующим отбором трансгенных клонов с помощью сред, содержащих соответствующие антибиотики (неомицин и пурамицин). Для анализа клонов трансгенных клеток использовали ПЦР.

Результаты исследования и обсуждение

В нашем исследовании показано, что программируемая нуклеаза AsCas12a (консенсус PAM – 5'-TTTV-3') вносит двуцепочечные разрывы ДНК в локусах геномов ИПСК человека, которые ассоциированы с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями (*MYBPC3* – эффективность (T7E1) $16,2 \pm 1,42\%$ и $13,4 \pm 0,91\%$, *APOE* – $25,3 \pm 1,76\%$, *LRRK2* – $23,5 \pm 1,86\%$ и $11,4 \pm 0,04\%$, *PRKN* – $20,6 \pm 0,63\%$ и $9,6 \pm 0,01\%$, *PSEN1* – $3,3 \pm 0,01\%$ и $4,2 \pm 0,01\%$, *PINK1* – $8,0 \pm 0,02\%$), что делает ее перспективным инструментом для нокаута генов и стимуляции процесса гомологичной рекомбинации в данном типе клеток. При этом линии ИПСК, несущие доксициклин-управляемый трансген программируемой нуклеазы AsCas12a, можно применять для создания изогенных клеточных моделей патологических процессов. Кроме того, установлено, что в линии ИПСК человека, несущей трансген AsCas12a (консенсус PAM – 5'-TYCV-3'), происходит успешная AsCas12a-опосредованная гомологичная рекомбинация 3'-об-

ласти гена *SOX6* с плазмидной донорной конструкцией, которая предназначена для маркирования экспрессии транскрипционного фактора *SOX6* с помощью флуоресцентного белка EGFP, что показывает перспективность использования данной линии клеток для создания трансгенных ИПСК человека. Нуклеаза *AsCas12a* показала значительный уровень модификации почти во всех анализируемых локусах. Возможно, это связано с выбранным нами подходом: *AsCas12a* не вносится в виде плазмиды или белка, а экспрессируется в клетке в ответ на добавление в культуральную среду доксицилина, что упрощает процесс редактирования и повышает его эффективность, так как во всех анализируемых клетках присутствует нуклеаза *AsCas12a*. Таким образом, *AsCas12a* можно эффективно использовать для внесения инсерций/делеций и нокаута генов.

Полученный нами уровень модификаций не является максимально возможным. Уже сейчас получены несколько мутантных *AsCas12a*, эффективность внесения разрывов которыми достигает 90% в определенных типах клеток [7], но, к сожалению, часть из этих ферментов показывают более высокую неспецифическую активность [8].

Путем CRISPR/SpCas9-опосредованной гомологичной рекомбинации в локусе *AAVS1* получено три клона ИПСК здорового донора и четыре клона ИПСК пациента с генетическим вариантом с.2013T>G (rs63750756, p.N279K) в гене *MAPT*, которые несут доксицилин-управляемый трансген биосенсора MitoTimer. Подтверждено, что полученные трансгенные клоны ИПСК экспрессируют маркеры самообновления и плюрипотентности клеток человека, имеют нормальный кариотип и могут быть дифференцированы в производные трех примитивных зародышевых листков – эктодермы, мезодермы, энтодермы. Биосенсор MitoTimer – локализующийся в митохондриях зеленый флуоресцентный белок Timer, слитый с сигнальным пептидом субъединицы *COX8A*, который определяет локализацию MitoTimer в митохондриальном матриксе. После трансляции и фолдинга MitoTimer флуоресцирует зеленым, а со временем пик эмиссии меняется на красный. Наблюдаемая эмиссия MitoTimer будет зависеть от продолжительности экспрессии и скорости включения и деградации белка в митохондриях. Это позволяет изучать темп биогенеза, относительный уровень оксидативного стресса и повреждение митохондрий [4]. Исследование работы биосенсора MitoTimer в дифференцированных производных пациент-специфичных ИПСК (дофаминергических нейронах) может дать новую информацию о молекулярно-генетических и биохимических механизмах патогенеза лобно-височной деменции с паркинсонизмом-17.

Заключение

Совместное использование технологии ИПСК и программируемых нуклеаз *AsCas12a* и *SpCas9* позволяет создавать широкий спектр клеточных моделей, включая линии плюрипотентных клеток с нокаутом генов, ассоциированных с наследственными болезнями человека, а также трансгенные линии, предназначенные для прижизненной визуализации клеточных процессов.

Список источников

1. Kim D., Kim J., Hur J.K., Been K.W., Yoon S.H., Kim J.S. Genome-wide Analysis Reveals Specificities of Cpf1 Endonucleases in Human Cells // *Nature Biotechnology*. 2016. Vol. 34, № 8. PP. 863–868. doi: 10.1038/nbt.3609
2. Zetsche B., Heidenreich M., Mohanraju P., Fedorova I., Kneppers J., DeGennaro E.M., Winblad N., Choudhury S.R., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Wu W.Y., Scott D.A., Severinov K., van der Oost J., Zhang F. Multiplex Gene Editing by CRISPR-Cpf1 Using a Single crRNA Array // *Nature Biotechnology*. 2017. Vol. 35, № 1. PP. 31–34. doi: 10.1038/nbt.3737
3. Strohkendl I., Saifuddin F.A., Gibson B.A., Rosen M.K., Russell R., Finkelstein I.J. Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA Targeting by Nucleosomes and Chromatin // *Science Advances*. 2021. Vol. 7, № 11. eabd6030. doi: 10.1126/sciadv.abd6030
4. Laker R.C., Xu P., Ryall K.A., Sujkowski A., Kenwood B.M., Chain K.H., Zhang M., Royal M.A., Hoehn K.L., Driscoll M., Adler P.N., Wessells R.J., Saucerman J.J., Yan Z. A Novel MitoTimer Reporter Gene for Mitochondrial Content, Structure, Stress, and Damage In Vivo // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, № 17. PP. 12005–12015. doi: 10.1074/jbc.M113.530527
5. Ghetti B., Oblak A.L., Boeve B.F., Johnson K.A., Dickerson B.C., Goedert M. Invited Review: Frontotemporal Dementia Caused by Microtubule-associated Protein Tau Gene (MAPT) Mutations: a Chameleon for Neuropathology and Neuroimaging // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2015. Vol. 41, № 1. PP. 24–46. doi: 10.1111/nan.12213
6. Павлова С.В., Валетдинова К.Р., Маланханова Т.Б., Поливцев Д.Е., Малахова А.А., Григорьева Е.В., Шевченко А.И., Закиян С.М., Медведев С.П. Трансгенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека ICG1022-A-6 и ICG1022-A-7 с доксициклин-управляемыми вариантами программируемой нуклеазы AsCas12a // *Онтогенез*. 2023. Т. 54, № 6. С. 415–428. doi: 10.31857/S047514502306006X
7. Zhang L., Zuris J.A., Viswanathan R., Edelstein J.N., Turk R., Thommandru B., Rube H.T., Glenn S.E., Collingwood M.A., Bode N.M., Beaudoin S.F., Lele S., Scott S.N., Wasko K.M., Sexton S., Borges C.M., Schubert M.S., Kurgan G.L., McNeill M.S., Fernandez C.A., Myer V.E., Morgan R.A., Behlke M.A., Vakulskas C.A. AsCas12a Ultra Nuclease Facilitates the Rapid Generation of Therapeutic Cell Medicines // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12, № 1. 2018. doi: 10.1038/s41467-021-24017-8
8. Kim H., Lee W.J., Kim C.H., Oh Y., Gwon L.W., Lee H., Song W., Hur J.K., Lim K.S., Jeong K.J., Nam K.H., Won Y.S., Lee K.R., Lee Y., Kim Y.H., Huh J.W., Jun B.H., Lee D.S., Lee S.H. Highly Specific Chimeric DNA-RNA-guided Genome Editing with Enhanced CRISPR-Cas12a System // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2022. Vol. 28. PP. 353–362. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.021

References

1. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):863-868. doi: 10.1038/nbt.3609
2. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*. 2017;35(1):31-34. doi: 10.1038/nbt.3737
3. Strohkendl I, Saifuddin FA, Gibson BA, Rosen MK, Russell R, Finkelstein IJ. Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA targeting by nucleosomes and chromatin. *Sci Adv*. 2021;7(11):eabd6030. doi: 10.1126/sciadv.abd6030
4. Laker RC, Xu P, Ryall KA, Sujkowski A, Kenwood BM, Chain KH, Zhang M, Royal MA, Hoehn KL, Driscoll M, Adler PN, Wessells RJ, Saucerman JJ, Yan Z. A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo. *J Biol Chem*. 2014;289(17):12005-12015. doi: 10.1074/jbc.M113.530527

- Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015;41(1):24-46. doi: 10.1111/nan.12213
- Pavlova SV, Valetdinova KR, Malankhanova TB, Polivtsev DE, Malahova AA, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Zakian SM, Medvedev SP. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a. *Russ J Dev Biol.* 2023;54(6):374-386. doi: 10.1134/S1062360423060061
- Zhang L, Zuris JA, Viswanathan R, Edelstein JN, Turk R, Thommandru B, Rube HT, Glenn SE, Collingwood MA, Bode NM, Beaudoin SF, Lele S, Scott SN, Wasko KM, Sexton S, Borges CM, Schubert MS, Kurgan GL, McNeill MS, Fernandez CA, Myer VE, Morgan RA, Behlke MA, Vakulskas CA. AsCas12a ultra nuclease facilitates the rapid generation of therapeutic cell medicines. *Nat Commun.* 2021;12(1):3908. doi: 10.1038/s41467-021-24017-8
- Kim H, Lee WJ, Kim CH, Oh Y, Gwon LW, Lee H, Song W, Hur JK, Lim KS, Jeong KJ, Nam KH, Won YS, Lee KR, Lee Y, Kim YH, Huh JW, Jun BH, Lee DS, Lee SH. Highly specific chimeric DNA-RNA-guided genome editing with enhanced CRISPR-Cas12a system. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;28:353-362. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.021

Информация об авторах:

Медведев Сергей Петрович, канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Ахмерова Валерия Игоревна, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); студент кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета (Новосибирск, Россия).

E-mail: v.akhmerova@g.nsu.ru

Надточий Юлия Андреевна, лаборант-исследователь лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); студент кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета (Новосибирск, Россия).

E-mail: y.nadtochii@g.nsu.ru

Григорьева Елена Викторовна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlana@bionet.nsc.ru

Павлова Софья Викторовна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Закян Сурен Минасович, д-р биол. наук, профессор, г.н.с., зав. лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия); г.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Sergey P. Medvedev, Cand.Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Senior Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Valeria I. Akhmerova, Research Assistant of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Graduate Student, Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: v.akhmerova@g.nsu.ru

Julia A. Nadtochy, Research Assistant of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Graduate Student, Department of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University (Novosibirsk, Russian Federation).

E-mail: y.nadtochii@g.nsu.ru

Elena V. Grigor'eva, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Sofia V. Pavlova, Cand.Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Suren M. Zakian, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation); Chief Researcher of the Laboratory of genomic medical technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Novosibirsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 29.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 29.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*