

ного проекта — дизайн и создание генетической конструкции, кодирующей рекомбинантное антитело, эффективно блокирующее взаимодействие IL-2 с IL-2R. На основе аминокислотной последовательности базиликсимаба мы создали его одноцепочечный аналог (ScFv) состоящий из фрагментов переменных доменов тяжелой и легкой цепей, соединенных между собой линкером. Мы полагаем, что создаваемое ScFv будет эффективно блокировать связывание IL-2 с IL-2R, а за счет меньшего размера легче проникать в ткани (~35 кДа против 143 кДа у базиликсимаба), обладая притом большей стабильностью. Показано, что созданная плазмидная конструкция pVax-antiCD25-scFv после трансфекции обеспечивает высокий уровень продукции antiCD25-scFv в среде культивирования. В настоящий момент проходит оценка эффективности нового антитела *in vitro*. В случае эффективности pVax-antiCD25-scFv можно будет применить как генно-терапевтический препарат или же в виде генномодифицированных клеток, продуцирующих antiCD25-scFv. Например, с помощью данной конструкции при необходимости можно усилить иммуносупрессивные свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Предложенный подход можно использовать для создания доступных альтернатив дорогим терапевтическим антителам.

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00439), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Карагяур М.Н.¹, Васильев П.А.²,
Дыйканов Д.Т.², Рысенкова К.Д.²,
Сёмина Е.В.², Кулебякин К.Ю.¹,
Тюрин-Кузьмин П.А.², Александрович Н.А.¹,
Шмакова А.А.², Рубцов Ю.П.²**

¹ *Институт регенеративной медицины,
Медицинский научно-образовательный центр
МГУ им. М.В. Ломоносова*

² *Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова
m.karagyaour@mail.ru*

ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ ГЕНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ С НЕСТАБИЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ

Клеточные линии являются удобной модельной системой для выяснения роли отдельных белков в развитии и патогенезе различных заболеваний. Для установления роли конкретного белка с помощью генетических методов, как правило, изменяют уровень синтеза белка интереса путем, в частности, увеличения уровня экспрессии кодирующего белок гена, либо, наоборот, снижения экспрессии гена или полного выключения синтеза белка путем генетического нокаута. Прицельное выключение конкретных генов, например с использованием технологии CRISPR/Cas9, достаточно просто, если модифицируемые клетки являются гаплоидными или диплоидными. Однако большинство популярных клеточных линий (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a и т.д.) характеризуются нестабильным кариотипом, т.е. различным количеством хромосом и числом копий генов (от 1 до 5 копий на клетку). Множественные копии генов практически невозможно выключить за

один раунд генетической модификации, а разное количество генов в отдельных клетках делает популяции, полученные из них гетерогенными. Помимо этого, использование популяций клеток, происходящих из отдельных клонов, требует тщательной проверки на отсутствие нежелательных модификаций в геноме (т.н. off-target модификаций), поскольку все изменения в геноме, в том числе и нецелевые, будут содержать все клетки клона. В то же время, если клеточную популяцию получить, используя модификацию сразу большого числа клеток, минуя этап клонирования, влияние различной копийности генов и каждой конкретной нецелевой модификации генома не будет заметно из-за многочисленности таких клеток в общем пуле. Однако выключение экспрессии генов в большой (многочисленной) популяции клеток с помощью CRISPR/Cas9 — это нетривиальная задача. В результате одного раунда трансфекции линий клеток (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) плазмидой pX458, содержащей гены wtSpCas9, флуоресцентного маркера GFP и направляющей РНК (gRNA) к генам интереса, с последующим обогащением трансфицированных клеток по флуоресценции GFP, модификации подвержены лишь 20–50% аллелей. Целью данной работы было разработать эффективный и воспроизводимый протокол CRISPR/Cas9-опосредованной генной модификации популяции клеток, минуя этап клонирования. С помощью 2–3 циклов модификации с последующим обогащением по GFP нам удалось получить популяции клеток с выраженным (практически полным) подавлением экспрессии целевых генов. У полученных таким образом популяций клеток не наблюдали увеличения частоты нецелевой модификации ДНК. Получена новая информация о целесообразности применения различных вариантов системы модификации генома CRISPR/Cas9 в данном протоколе. Созданный протокол позволяет эффективно выключать гены в клеточных линиях с нестабильным кариотипом (HEK293, 3T3, HeLa, HepG2, Neuro2a) или в клеточных линиях, клонирование которых затруднено (HepG2).

Финансирование исследования: *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086), с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках гранта РНФ № 14-50-00029 и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.*

**Карагяур М.Н.¹, Стамбольский Д.В.¹,
Балабаньян В.Ю.¹, Климович П.С.²,
Ростовцева А.И.², Сёмина Е.В.²**

¹ *Институт регенеративной медицины,
Медицинский научно-образовательный центр
МГУ им. М.В. Ломоносова*

² *Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова
m.karagyaour@mail.ru*

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ МОЗГОВОЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА, ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕИННЕРВАЦИИ

Травмы периферических нервов являются одной из значимых причин инвалидизации. Проблема неэффективной посттравматической реиннервации