

КОЛЛЕКЦИЯ ЛИНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

УДК 576.5+577.2

Паспорт линии плюрипотентных стволовых клеток

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 И ICGi022-A-5 С ВНЕСЕННОЙ В ГЕН *MYBPC3* С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 МУТАЦИЕЙ *p.Asn515del*

© 2023 г. С. В. Павлова^а, Л. Ш. Шаяхметова^а, К. А. Проняева^а,
А. Е. Шульгина^а, С. М. Закиян^а, Е. В. Дементьева^{а, *}

^аФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, просп. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 10.12.2022 г.

До 60% случаев гипертрофической кардиомиопатии обусловлены мутациями в генах, отвечающих за функционирование саркомеров. Однако не для всех вариантов, обнаруженных в ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией генах, в настоящее время известно их клиническое значение. Новые возможности для выяснения клинического значения генетических вариантов открывает использование методов редактирования нуклеотидных последовательностей. Трехнуклеотидная делеция с.1543_1545delAAC (*p.Asn515del*) с неясным клиническим значением была внесена в ген *MYBPC3* индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора с помощью системы CRISPR/Cas9. В результате были получены три линии ИПСК (ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5), гомозиготные по данной мутации. Линии ИПСК с внесенной делецией имели характерную для плюрипотентных клеток человека морфологию, нормальный кариотип (46,XX), экспрессировали маркеры плюрипотентного состояния (OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4) и были способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке. Исследование свойств кардиомиоцитов, полученных при направленной дифференцировке линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5, позволит установить патогенетический вклад варианта *p.Asn515del* в гене *MYBPC3* в развитие гипертрофической кардиомиопатии.

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

DOI: 10.31857/S0475145023010111, **EDN:** FRUOIN

ВВЕДЕНИЕ

В ходе генетического анализа пациентов с гипертрофической кардиомиопатией нами был выявлен пациент, имеющий вариант *p.Asn515del* (с.1543_1545delAAC) в 17-м экзоне гена *MYBPC3* (Дементьева и др., 2020). Данный вариант представляет собой делецию одной аминокислоты и прежде уже обнаруживался у пациентов с гипертрофической (Поляк и др., 2016) и дилатационной (Waldmüller et al., 2011) кардиомиопатиями, однако его клиническое значение остается неясным. Поскольку большие перспективы для изучения клинического значения генетических вариантов открывает получение изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, имеющих одинаковый генетический фон и различающихся лишь присутствием одной мутации,

было решено внести вариант *p.Asn515del* в ген *MYBPC3* индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора ICGi022-A (Malakhova et al., 2020).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Внесение мутации p.Asn515del
в ген MYBPC3 ИПСК здорового донора*

Направляющую РНК и донорный олигонуклеотид выбирали с помощью ресурсов Benchling (<https://www.benchling.com/>) и IDT (<https://www.idtdna.com/>) (табл. 1). 20 пмоль белка Cas9_NLS (NEB) и 100 пмоль направляющей РНК (Synthego) инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Полученные рибонуклеопротеиновые комплексы вместе с 300 нг одноцепочечного

донорного олигонуклеотида (Biolegio) доставляли в 1×10^5 ИПСК линии ICGi022-A с помощью электропорации на приборе Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific) (программа: 1100 V, 30 мс, 1 импульс). После электропорации клетки переносили на слой митотически инактивированных фибробластов мыши (фидера) в среду без антибиотика с добавлением 10 нг/мл Y-27632 (Sigma-Aldrich). Через 48 ч клетки субклонировали в 96-луночные планшеты. Клоны ИПСК культивировали при 37°C в 5% CO₂ в среде KnockOut DMEM, содержащей 15% KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 1× пенициллин-стрептомицин, 1 mM GlutaMAX (все реактивы – ThermoFisher Scientific), 0.05 mM 2-меркаптоэтанол (Amresco) и 10 нг/мл bFGF (SCI-store). ИПСК пассировали в соотношении 1 : 10 с использованием TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific) каждые 4–5 дней.

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из ИПСК с использованием набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Анализ внесенных мутаций и нецелевой активности системы CRISPR/Cas9

Детекцию наличия мутации p.Asn515del в клонках ИПСК, амплификацию участков геномной ДНК, содержащих 17-й экзон гена *MYBPC3* или предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9, проводили с помощью ПЦР на приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix). Программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 с, 58°C – 15 с, 72°C – 15 с; 72°C – 5 мин (анализ мутаций) и 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с; 72°C – 5 мин (анализ нецелевой активности). Использованные праймеры приведены в табл. 1. Реакции секвенирования по Сэнгеру выполняли с использованием Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали в ЦКП “Геномика” СО РАН на генетическом анализаторе ABI 3130XL.

Выявление микоплазмы и эписом

Детекцию контаминации микоплазмами и наличия эписом в линиях ИПСК проводили с помощью ПЦР. Программы: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 67°C – 15 с, 72°C – 20 с; 72°C – 5 мин (микоплазма) и 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 15 с, 62°C – 15 с, 72°C – 15 с; 72°C – 5 мин (эписомы). Праймеры указаны в табл. 1.

Анализ кариотипа

Кариотипирование было выполнено в Томском НИМЦ согласно Международной системе цитогенетической номенклатуры хромосом человека.

Спонтанная дифференцировка in vitro

Спонтанную дифференцировку ИПСК посредством формирования эмбриоидных телц выполняли, как описано ранее (Dementyeva et al., 2021).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде 10 мин, пермеабилizировали в 0.4% Тритон-X100 20 мин, инкубировали с 1% БСА 30 мин (все процедуры выполнялись при комнатной температуре). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4°C, а со вторичными антителами – 1 ч при комнатной температуре. Используемые антитела перечислены в табл. 1. Отмывки от несвязавшихся антител проводили в PBS 2 раза по 15 мин. Ядра контрастировали с использованием DAPI (Sigma-Aldrich). Микрофотографии были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E и программного обеспечения NIS Elements.

Количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию 1–2 мкг РНК проводили с использованием ревертазы M-MuLV (Biolabmix). Количественную ОТ-ПЦР выполняли на приборе LightCycler 480 System (Roche) с набором BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Biolabmix). Программа: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 10 с, 60°C – 1 мин. Значения СТ нормализовали к бета-актину с помощью ΔΔСТ-метода.

STR анализ

Аутентификацию линий ИПСК осуществляла компания “Геноаналитика” (<https://www.genanalytica.ru>) с помощью наборов AmpFlSTR Identifier Direct PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN) и прибора 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Для редактирования геномной ДНК ИПСК здорового донора была использована система CRISPR/Cas9, состоящая из белка Cas9 и направляющей РНК, включающей последовательность (спейсер), комплементарную участку 17-го экзона гена *MYBPC3* (протоспейсеру). Комплексы из

Таблица 1. Антитела и олигонуклеотиды, использованные в исследовании

	Антитела			
	Антитело	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Макеры плюрипотентности	Mouse IgG2b anti-OCT3/4	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, sc-5279	RRID: AB_628051
	Rabbit IgG anti-NANOG	1 : 200	ReproCELL, RCAB003P	RRID: AB_2714012
	Mouse IgG3 anti-SSEA4	1 : 200	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1 : 200	Abcam, ab16288	RRID:AB_778563
Маркеры дифференцированных производных	Mouse IgG2a anti-TUBB3	1 : 500	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
	Chicken IgG anti-MAP2	1 : 1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
	Mouse IgG2a anti- α SMA	1 : 100	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
	Rabbit IgG anti-Nkx-2.5 (H-114)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-14033	RRID:AB_650281
	Mouse IgG1 anti-CK18	1 : 100	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
	Mouse IgG1 anti-HNF3 β	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology, sc-374376	RRID: AB_10989742
Вторичные антитела	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11031	RRID:AB_144696
	Goat anti-Mouse IgG3 Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
	Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A21043	RRID:AB_2535712
	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
	Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1 : 400	ThermoFisher Scientific, A11078	RRID: AB_2534122
	Goat Anti-Chicken IgY H&L, Alexa Fluor 488	1 : 400	Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653

Таблица 1. Окончание

	Олигонуклеотиды		
	Ген/локус	Размер продукта	Прямой/обратный праймер (5'–3')
Детекция эписомных векторов	oriP	544 пн	TTCCACGAGGGTAGTGAACC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Макеры плюрипотентности (колич. ОТ-ПЦР)	<i>OCT4</i>	94 пн	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>NANOG</i>	391 пн	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC/ CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCACC
	<i>SOX2</i>	100 пн	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Референсный ген (колич. ОТ-ПЦР)	<i>ACTB</i>	93 пн	GCACAGAGCCTCGCCTT/ GTTGTCGACGACGAGCG
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280 пн	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
Детекция внесения мутации p.Asn515del	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	253 пн	CAGAGACACCACCTAATCATAG/ GAGATGAGAAGGATGAGGTTTAGG
Анализ всех внесенных мутаций	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	408 пн	CAAATGGTGAGTTCCAGAAGC/ GAGATGAGAAGGATGAGGTTTAGG
Последовательность протоспейсера для направляющей РНК	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	20 н.	ACACCACCTGATCATCAACG
Последовательность донорного олигонуклеотида	<i>MYBPC3</i> , экзон 17	90 н.	CGCTAGTGACAGTGCATAGTGCCCCGCGT- CCTCCAGCATGGCCTCGATGATTAGGTGGT- GTCTCTGCCCCGTCCTTCTTGAACCGGTATT
Анализ предсказанных сайтов нецелевой активности системы CRISPR/Cas9	chr14:56408346-56408720	375 пн	ACAGCCACAGCAATCCTAAG/ GACAGGGCCCTTTACAGAATAG
	<i>SLC9A8</i> , интрон 14	536 пн	CGGTGGAGTCCTAGCTAATAGA/ TCAGCCTCCGAGTGAAGAA
	<i>RTL8B</i> , экзон 1	511 пн	AGGAGGCACAAAGCCAATTA/ TTCTGTCCCAGATGTTGAATCC
	<i>SLC44A1</i> , экзон 16	344 пн	TTGGGAATAATTGGGCAGATAGA/ CATTAAGGCAACACAGCAGAAG

направляющей РНК и белка Cas9 вместе с одноцепочечным донорным олигонуклеотидом, комплементарным участку 17-го экзона гена *MYBPC3* и содержащим трехнуклеотидную делецию AAC (p.Asn515del), были доставлены в клетки линии

ICGi022-A с помощью электропорации. Полученные после электропорации клоны ИПСК были проанализированы посредством ПЦР с использованием пары праймеров, которая позволяет детектировать присутствие варианта p.Asn515del. В ре-

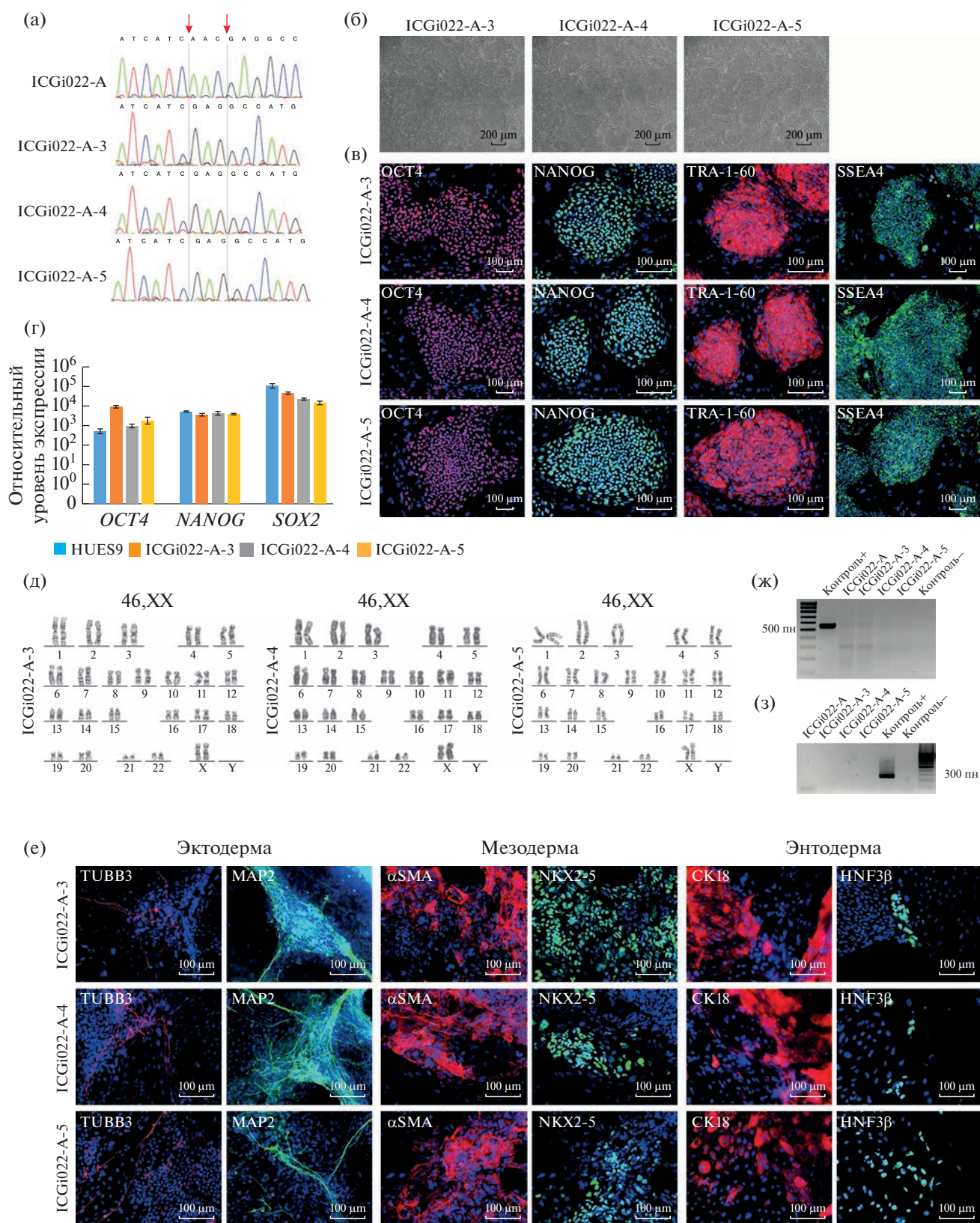


Рис. 1. Начало.

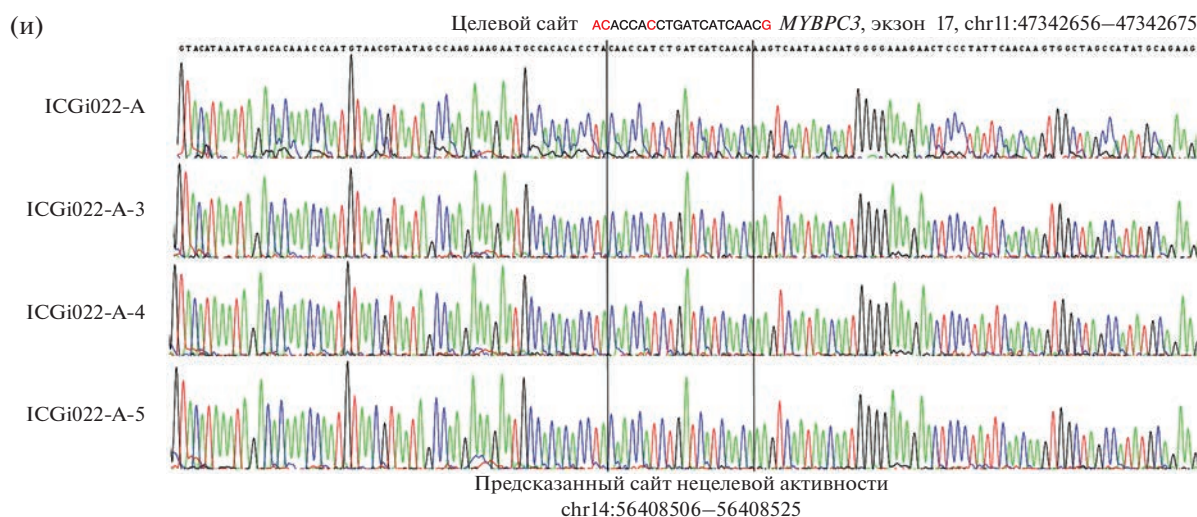


Рис. 1. Характеристика линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, ICGi022-A-5 с внесенной в ген *MYBPC3* мутацией p.Asn515del. (а) В трех линиях ИПСК, полученных в результате редактирования гена *MYBPC3* линии ИПСК ICGi022-A, выявлена гомозиготная мутация p.Asn515del. (б) Морфология линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5. Масштабная линейка — 200 мкм. (в) Экспрессия транскрипционных факторов OCT4 и NANOG и поверхностных антигенов TRA-1-60 и SSEA4 в полученных линиях ИПСК. Масштабная линейка — 100 мкм. (г) Анализ экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* методом ПЦР в реальном времени в линиях ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5. Линия эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 была использована в качестве контроля. (д) Кариотип полученных линий ИПСК. (е) Подтверждение способности линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 дифференцироваться в производные трех зародышевых листков. Масштабная линейка — 100 мкм. (ж) ПЦР-тест показал отсутствие в полученных линиях ИПСК эписомных векторов. (з) ПЦР-тест показал отсутствие контаминации линий ИПСК микоплазмами. (и) Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в линиях ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 в предсказанном сайте нецелевой активности chr14:56408506–56408525.

зультате было отобрано 12 позитивных на наличие варианта p.Asn515del клонов. Для этих клонов было проведено секвенирование 17-го экзона гена *MYBPC3*. Три клон оказались гомозиготными по трехнуклеотидной делеции в гене *MYBPC3* (рис. 1а). Остальные клоны в одном аллеле имели вариант p.Asn515del, а во втором — различные варианты делеций и инсерций. Три линии ИПСК, гомозиготные по варианту p.Asn515del, ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, ICGi022-A-5, были выбраны для дальнейшей работы и детально охарактеризованы. Линии ИПСК демонстрировали характерную для плюрипотентных стволовых клеток человека морфологию (рис. 1б) и экспрессировали маркеры плюрипотентного состояния: транскрипционные факторы OCT4, NANOG и поверхностные антигены TRA-1-60 и SSEA4 (рис. 1в). Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени показал, что уровень экспрессии генов плюрипотентности *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* в этих линиях сопоставим с уровнем их экспрессии в линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9 (рис. 1г). G-бэндинг линий ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 на 8–12 пассажах показал, что клетки сохраняли нормальный кариотип — 46,XX (рис. 1д). Способность линий ИПСК давать производные трех зародышевых листков оценивалась посредством спонтанной дифферен-

цировки в эмбриоидных тельцах. Иммуофлуоресцентное окрашивание дифференцированных клеток выявило экспрессию маркеров эктодермы (β 3-тубулина (TUBB3) и MAP2), мезодермы (гладкомышечного α -актина (α SMA) и транскрипционного фактора NKX2-5), энтодермы (ядерного фактора гепатоцитов HNF3 β и цитокератина 18 (СК18)) (рис. 1е). В полученных линиях ИПСК, как и в исходной линии ICGi022-A, отсутствовали эписомные векторы (рис. 1ж), а также контаминация микоплазмами (рис. 1з). Анализ коротких tandemных повторов (STR) в линиях ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 подтвердил их идентичность исходной линии ИПСК ICGi022-A по 26 полиморфным локусам (данные доступны по запросу у авторов). С помощью секвенирования по Сэнгеру в полученных линиях ИПСК было продемонстрировано отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 4 предсказанных с помощью ресурса Benchling (<https://www.benchling.com/>) сайтах. Пример анализа одного из предсказанных сайтов нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 представлен на рис. 1и.

Паспорт линий ИПСК ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 представлен в табл. 2, полная характеристика этих линий приведена в табл. 3.

Таблица 2. Паспорт линий ИПСК человека ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5

Параметр	Описание
Уникальный идентификатор	ICGi022-A-3 ICGi022-A-4 ICGi022-A-5
Альтернативное название линии	K7-MYBPC3-N515del-1 K7-MYBPC3-N515del-2 K7-MYBPC3-N515del-3
Учреждение	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 42 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и p53 shRNA
Клональность	Клональные
Подтверждение элиминации репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Генетическая модификация	Да
Вид генетической модификации	Внесенная делеция трех нуклеотидов
Заболевание	Гипертрофическая кардиомиопатия
Ген/локус	<i>MYBPC3</i> :c.1543_1545delAAC (p.Asn515del), rs730880643
Метод внесения модификации/используемая сайт-специфическая нуклеаза	Система CRISPR/Cas9
Способ доставки сайт-специфической нуклеазы	Электропорация RNP (рибонуклеопротеиновыми комплексами)
Внесенный в клетки генетический материал	Донорный олигонуклеотид, содержащий мутацию с.1543_1545delAAC (p.Asn515del)
Метод анализа внесенной модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру 17-го экзона гена <i>MYBPC3</i>
Способ оценки нецелевой активности	Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, содержащих предсказанные сайты нецелевой активности системы CRISPR/Cas9
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных телес
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	Изучение патогенетического вклада варианта с.1543_1545delAAC (p.Asn515del) в гене <i>MYBPC3</i> в развитие гипертрофической кардиомиопатии
Способ культивирования	На слое митотически инактивированных фибробластов мыши (фидера)
Среда культивирования	KnockOut DMEM (ThermoFisher Scientific)
Температура, °C	37

Таблица 2. Окончание

Параметр	Описание
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	TrypLE™ Express Enzyme (ThermoFisher Scientific)
Кратность пересева	1 : 10
Криоконсервация	90% FBS, 10% DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-3 https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-4 https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi022-A-5
Дата паспортизации/депонирования	19/08/2022

Таблица 3. Характеристика линий ИПСК человека ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5

Параметры	Метод	Результат	Данные
Морфология	Микрофотография в фазовом контрасте	Характерная для плюрипотентных клеток человека морфология	Рис. 1б
Фенотип	Качественный анализ <i>Иммунофлуоресцентное окрашивание</i>	Положительное окрашивание на маркеры плюрипотентности: OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA4	Рис. 1в
	Количественный анализ <i>ОТ-ПЦР в реальном времени</i>	Экспрессия маркеров плюрипотентности: <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i>	Рис. 1г
Генотип	Кариотипирование	46,XX Разрешение 450–500	Рис. 1д
Идентификация	STR анализ	26 из 26 полиморфных локусов совпадают с исходной линией ICGi022-A	Данные доступны по запросу у авторов
Анализ внесенной генетической модификации	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Гомозиготная мутация с.1543_1545del (p.Asn515del) в гене <i>MYBPC3</i>	Рис. 1а
Анализ нецелевой активности	ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру	Отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в 4 предсказанных сайтах	Рис. 1и
Контаминация	Микоплазма	Отсутствует	Рис. 1з
Потенциал дифференцировки	Формирование эмбрионидных тел, иммунофлуоресцентное окрашивание	Положительное окрашивание на маркеры трех зародышевых листков: TUBB3 и MAP2 (эктодерма); αSMA и NKX2-5 (мезодерма); CK18 и HNF3β (энтодерма)	Рис. 1е
Инфекции донора	ВИЧ, гепатит В, гепатит С	Нет данных	Нет данных
Дополнительная информация о генотипе	Группа крови	Нет данных	Нет данных
	HLA-типирование	Нет данных	Нет данных

БЛАГОДАРНОСТИ

Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания проводили с использованием ресурсов ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, поддержанного Бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWN-2022-0015.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00271).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017. Пациентом было дано добровольное информированное согласие.

Для получения фидера все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.В. Павлова, Е.В. Дементьева и С.М. Закиан разработали дизайн эксперимента, провели анализ получен-

ных данных и участвовали в написании статьи. С.В. Павлова и Л.Ш. Шаяхметова осуществили подбор направляющей РНК и донорного олигонуклеотида для внесения мутации с помощью системы CRISPR/Cas9. С.В. Павлова провела эксперименты по редактированию генома ИПСК. Е.В. Дементьева, К.А. Проняева и А.Е. Шульгина охарактеризовали полученные в результате редактирования линии ИПСК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дементьева Е.В., Вяткин Ю.В., Кретов Е.И. и др. Генетический анализ пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // *Гены & Клетки*. 2020. Т. XV. № 3. С. 68–73.
- Поляк М.Е., Ховалыг А.Б., Букаева А.А. и др. Спектр мутаций в гене MYBPC3 у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // *Медицинская генетика*. 2016. Т. 15. № 8. С. 26–29.
- Dementyeva E.V., Pavlova S.V., Chernyavsky A.M., Zakian S.M. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi029-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.N515del mutation in MYBPC3 // *Stem Cell Res.* 2021. V. 53. 102344.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // *Stem Cell Res.* 2020. V. 48. 101952.
- Waldmüller S., Erdmann J., Binner P. et al. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure // *Eur. J. Heart Fail.* 2011. V. 13. № 11. P. 1185–1192.

Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 with p.Asn515del Mutation Introduced in MYBPC3 Using CRISPR/Cas9

S. V. Pavlova¹, L. Sh. Shayakhmetova¹, K. A. Pronyaeva¹, A. E. Shulgina¹, S. M. Zakian¹, and E. V. Dementyeva^{1, *}

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prospekt Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Up to 60% of hypertrophic cardiomyopathy cases are due to mutations responsible for sarcomere functioning. However, clinical significance is known not for all variants found in hypertrophic cardiomyopathy-associated genes. Using methods of nucleotide sequence editing opens new prospects for clarifying clinical significance of the variants. A trinucleotide deletion c.1543_1545delAAC (p.Asn515del) with uncertain significance was introduced in MYBPC3 of induced pluripotent stem cells (iPSCs) of a healthy donor by CRISPR/Cas9. Three iPSC lines (ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5) homozygous at the mutation were generated. The iPSC lines with the introduced deletion demonstrated morphology characteristic of human pluripotent cells, normal karyotype (46,XX), expressed markers of the pluripotent state (OCT4, NANOG, TRA-1-60, SSEA-4), and were able to give rise to derivatives of three germ layers during spontaneous differentiation. Studying properties of cardiomyocytes obtained under directed differentiation of the ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 iPSC lines allows establishing pathogenetic contribution of the p.Asn515del variant in MYBPC3 to hypertrophic cardiomyopathy development.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, variants of unknown significance, induced pluripotent stem cells, CRISPR/Cas9